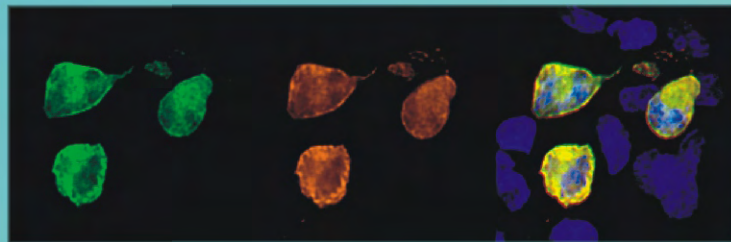


ENTDECKUNG UND CHARAKTERISIERUNG EINER NEUEN GENFAMILIE, SBFDCP7, BEI VERTEBRATEN UND BAKTERIEN

JOSÉ RODRIGO GODOY BERTHET



INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2007

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2007

© 2007 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie,
Fachbereich Veterinärmedizin der
Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Ernst Petzinger

Entdeckung und Charakterisierung einer neuen Genfamilie, SBFDCP7, bei Vertebraten und Bakterien

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von
José Rodrigo Godoy Berthet
Tierarzt aus Traiguén, Chile

Gießen 2006

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. M. Reinacher

Gutachter: Prof. Dr. Ernst Petzinger
Prof. Dr. Till Rümenapf

Tag der Disputation: 09. Januar 2007

*„Bajo el cielo nacido tras la lluvia
escucho un leve deslizarse de remos en el agua...”*

Jorge Teillier

*Marcela und
unserem Sohn Vicente Jesús
in Liebe und Bewunderung gewidmet*

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abbildungen	iv
Verzeichnis der Tabellen	v
Abkürzungen	vi
1. Einleitung	1
2. Literaturübersicht	3
2.1 Grundlagen des Membrantransportes	3
2.2 Funktionelle Unterschiede von Membrantransportsystemen	3
2.3 Die Superfamilie der Solute Carrier (SLC)	5
2.4 Die Familie der Sodium Bile Acid Symporter (SBF)	5
2.5 Die Solute Carrier-Familie 10 (SLC10)	7
2.5.1 Der natriumabhängige Gallensäuretransporter der Leber NTCP	7
2.5.2 Der natriumabhängige Gallensäuretransporter des Dünndarms ASBT	8
2.5.3 Der natriumabhängige Steroidsulfattransporter SOAT	8
2.6 Die Familie der ACR3-Carrier	9
2.7 Zielsetzung der Arbeit	11
3. Material	13
3.1 Verwendete Primer	13
3.2 Klonierung, cRNA-Synthese und Insertion des FLAG-Motivs	15
3.2.1 Bakterienstämme	15
3.2.2 Vektoren	15
3.2.3 Kulturmedien	18
3.2.4 Agarose-Gelelektrophorese	18
3.2.5 Enzyme	19
3.2.6 Kommerziell erhältliche Kits und Material	20
3.2.7 cDNA-Panels und RNA	20
3.3 Expression in <i>Xenopus laevis</i> -Oozyten	20
3.3.1 Versuchstiere	20
3.3.2 Verwendete Lösungen und Puffer für die Oozyten	20
3.3.3 Radioaktiv markierte Substanzen	21
3.3.4 Materialien	21
3.4 Immunfluoreszenz in <i>Xenopus laevis</i> -Oozyten	21
3.4.1 Verwendete Lösungen und Puffer	21
3.4.2 Antikörper	22
3.5 Agarose/Formaldehyd-Gelelektrophorese und Northern Blot	22
3.5.1 Verwendete Lösungen und Puffer	22
3.5.2 Gelelektrophorese	23
3.5.3 Blotten	23
3.6 Zellkultur	24
3.6.1 Eukaryontische Zelllinie	24
3.6.2 Zellkulturbedarf	24
3.6.3 Zellkulturmedien und Zusätze	25
3.6.4 Transiente Transfektion in HEK293-Zellen	25
3.7 Immunfluoreszenz	25
3.7.1 Primäre und sekundäre Antikörper	25

3.7.2 Reagenzien und Puffer	26
3.7.3 Verwendete Lösungen und Puffer	26
3.8 Reagenzien	27
3.9 Geräte	27
3.10 Bioinformatik	28
4. Methoden	30
4.1 Allgemeine molekularbiologische Methoden	30
4.2 Total-RNA Isolierung aus tierischem Gewebe	31
4.3 RNA-Gele zur Qualitätskontrolle	32
4.4 Gewinnung von polyA ⁺ -RNA aus Total-RNA	32
4.5 cDNA-Synthese	33
4.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	34
4.6.1 Klonierungs-PCR	34
4.6.2 Mutagenese-PCR mit <i>DpnI</i> -Restriktion	35
4.7 Klonierung	38
4.8 Heterologe Expression in <i>Xenopus laevis</i> -Oozyten	41
4.8.1 Linearisierung der Plasmid-DNA und Abschneiden überhängender 3'-Enden	41
4.8.2 cRNA-Synthese	42
4.8.3 Froschoperation zur Entnahme der Oozyten	43
4.8.4 Aufbereitung der Oozyten	43
4.8.5 Mikroinjektion der Oozyten	44
4.8.6 Transportmessung an Oozyten	44
4.9 Nachweis der Expression mittels FLAG-Tag und Immunfluoreszenz an Oozyten	45
4.9.1 Präparation und Permeabilisierung der Oozyten, primäre Antikörperreaktion	45
4.9.2 Sekundäre Antikörperreaktion	45
4.9.3 Fixierung und Einbettung der Oozyten	46
4.9.4 Einbettung der Oozyten und Schneiden der Präparate	46
4.10 Northern Blot	47
4.10.1 Agarose/Formaldehyd-Gelelektrophorese	47
4.10.2 Übertragung der RNAs auf eine Nylonmembran (Transferring)	47
4.10.3 Erstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden	48
4.10.4 Hybridisierung	50
4.11 Subklonierung in den Vektor pcDNA9	50
4.12 Transiente Transfektion in HEK293-Zellen	51
4.13 Indirekte Immunfluoreszenz in HEK293-Zellen	51
5. Ergebnisse	53
5.1 Klonierung des P7 von Mensch, Ratte, Maus und Frosch	53
5.1.1 Die <i>in silico</i> Identifizierung der P7-Proteine	53
5.1.2 Klonierung der Leserahmen und genomische Organisation der <i>P7</i> -Gene	55
5.1.3 Alternatives Spleißen der <i>P7</i> -Transkripte	57
5.1.4 Im Genom von <i>Xenopus laevis</i> existieren zwei <i>P7</i> -Gene	59
5.1.5 Proteinsequenz und SBF-Domäne-Architektur der P7-Proteine	60
5.1.6 Membrantopologie der P7-Isoformen	63
5.2 Gewebe-Expression von P7	64
5.3 Heterologe Expression von P7 in <i>Xenopus laevis</i> -Oozyten	66

5.4 Expression und Lokalisation von P7 in <i>Xenopus laevis</i> -Oozyten	67
5.5 Expression und Lokalisation von Mensch und Ratte P7 in HEK293-Zellen	69
5.6 P7: Membrantopologie	72
5.7 Bestimmung des Molekulargewichts	73
5.8 P7-verwandte Sequenzen: Entdeckung einer neuen Genfamilie	76
6. Diskussion	81
6.1 Das „Sodium Bile acid Family Domain Containing Protein 7“ SBFDCP7	81
6.2 SBFDCP7: Phylogenie	82
6.3 SBFDCP7: Genomische Organisation	83
6.4 SBFDCP7: Alternatives Spleißen	83
6.5 SBFDCP7: Expression und Membrantopologie	85
6.6 SBFDCP7: mögliche Funktionen	87
6.7 SBFDCP7: Taxonomische Aufgliederung	90
6.8 Perspektive	91
7. Zusammenfassung	92
8. Summary	94
9. Literaturverzeichnis	95
10. Anhang	100
10.1 Sequenzen	100
10.2 Transmembrandomäne-Topologie	109
10.3 Weitere P7-verwandte Sequenzen von Wirbeltieren und Bakterien	109
10.4 Alignment der SBFDCP7-Familie	110
Danksagungen	114

Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1:	Verteilung der molekularen Funktionen von humanen Genen	1
Abb. 2:	Übersicht über Membrantransporter in biologischen Membranen	4
Abb. 3:	Mechanismen der Arsen-Resistenz in Prokaryonten und Eukaryonten	10
Abb. 4:	SBF-Domäne enthaltende Proteine	12
Abb. 5:	Primer-Design zur Insertion des FLAG-Motivs	36
Abb. 6:	Überblick über die <i>QuickChange site-directed mutagenesis</i>	37
Abb. 7:	Vom „Screening zur Funktion“ eines Gens	39
Abb. 8:	Das Brücke-Modell des Northern Blots	48
Abb. 9:	Das „Nick-Translation“ Prinzip	49
Abb. 10:	Die Anregungs- und Emissionskurven der verwendeten Fluorophore	52
Abb. 11:	Die <i>in silico</i> Klonierungsstrategie	54
Abb. 12:	Ergebnisse der RT-PCR zur Klonierung von P7 des Menschen	56
Abb. 13:	Genomische Organisation und alternatives Spleißen des humanen P7-Gens	58
Abb. 14:	Genomische Organisation und alternatives Spleißen des P7-Gens der Maus	59
Abb. 15:	Alignment der Proteinsequenzen von Mensch, Ratte, Maus und Frosch P7	61
Abb. 16:	Transmembrandomänen-Modell des humanen P7	62
Abb. 17:	P7-Isoformen bei Mensch und Maus	63
Abb. 18:	RT-PCR-Expressionsprofile der P7-Gene von Mensch, Ratte, Maus und Frosch	65
Abb. 19:	Northern Blot Analyse des P7-Gens der Ratte	66
Abb. 20:	Nachweis der Expression der P7-Proteine mittels FLAG-Tag in <i>X. laevis</i> -Oozyten	68
Abb. 21:	Position der eingeführten <i>in silico</i> Mutation in Ratte P7	69
Abb. 22:	Expression von Human und Ratte P7 in HEK293-Zellen	70
Abb. 23:	Expression von Human und Ratte P7 in HEK293-Zellen (vergrößert)	70
Abb. 24:	Colokalisation von Human und Ratte P7 mit dem ER-Marker Calnexin	71
Abb. 25:	Dreidimensionales Bild von Ratte P7	71
Abb. 26:	Membrantopologie und Membranlokalisation von Human und Ratte P7	74
Abb. 27:	10-TMD-Modell, Immunpräzipitation und Nachweis der HA1- und FLAG-Epitope	75
Abb. 28:	Gruppen-Einteilung der P7-ähnlichen Sequenzen	76
Abb. 29:	Vergleich der SBF-Domäne von P7 und klassischen SLC10- und ACR3-Carriern	79
Abb. 30:	Phylogenetischer Baum der SBF-Superfamilie	82
Abb. 31:	Genomische Organisation der SLC10- und SBFDCP7-Gene	84
Abb. 32:	Vergleich der Membrantopologie und Aminosäuresequenzen eukaryotischer und prokaryotischer Mitglieder der SBFDCP7-Familie	86
Abb. 33:	Arsenit-Entgiftung bei Säugetieren	88
Abb. 34:	Taxonomische Augliederung der SBF-Familien	90

Verzeichnis der Tabellen

Tab. 1:	Auszug aus der Liste der SLC-Transporterfamilien	6
Tab. 2:	Mitglieder der SLC10-Familie	7
Tab. 3:	<i>In silico</i> identifizierte P7-Proteine von Mensch, Ratte, Maus und Frosch	55
Tab. 4:	Molekulare Eigenschaften der klonierten P7 cDNA-Sequenzen von Mensch, Ratte, Maus und Frosch	56
Tab. 5:	Intron/Exon-Organisation des humanen P7-Gens	57
Tab. 6:	Vergleich der Proteinsequenzen von P7 des Menschen, der Ratte, der Maus und des Frosches	60
Tab. 7:	Testmessungen mit den P7-Proteinen von Mensch, Maus und Ratte	67
Tab. 8:	Vorhergesagte zelluläre Lokalisation der P7-Proteine	68
Tab. 9:	Vergleich der Transmembrantopologie des humanen P7	72
Tab. 10:	Sequenzverwandtschaft der P7-Proteine von Wirbeltieren, Pflanzen, Hefen und Bakterien	78
Tab. 11:	P7-verwandte Sequenzen von Wirbeltieren, Pflanzen, Hefen und Bakterien	79

Abkürzungen

%	Prozent
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
ABC	ATP-Binding-Cassette
Asbt	Apical sodium-dependent bile acid transporter
ATP	Adenosintriphosphat
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	complementary DANN
Chr.	Chromosom
Ci	Curie
cpm	counts per minute (Impulse pro Minute)
cRNA	complementary RNA
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
DDBJ	DNA Data Bank of Japan
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DHEAS	Dehydroepiandrosteronsulfat
D-MEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonucleic acid
dNTPs	Desoxynukleotidtriphosphate
dpm	disintegration per minute (Zerfall pro Minute)
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EBI	European Bioinformatics Institute
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethylethyl)-tetraessigsäure
EMBL	European Molecular Biology laborator
FKS	Fetales Kälberserum
g	Gramm
h	Stunde
HEK	human embryonic kidney
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
IPTG	Isopropyl-1-Thio-β-D-Galaktopyranosid
Isbt	Ileal sodium-dependent bile acid transporter
IU	International Unit (Internationale Einheit)
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria Bertani
M	Molar (Mol pro Liter)
mA	Milliampere
MCS	Multiple cloning site
MDR	Multidrug-resistance
min	Minute
MMLV	Moloney-Murine Leukemia Virus, recombinant
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
MRP	Multidrug-resistance-associated protein

Ntcp	Na ⁺ /taurocholate cotransporting polypeptide
NZY	NZ-amine/yeast extract
OD	Optische Dichte
ORF	Open reading frame (offener Leserahmen)
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der H ₃ O ⁺ -Ionenkonzentration
RNA	Ribonucleic acid
rpm	rotations per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse transcriptase–PCR
s	Sekunden
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SSC	Sodium chloride – sodium citrat solution
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetate-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
T _m	Schmelztemperatur der Primer
TMD	Transmembrandomäne
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
Triton X-100	Octylphenylpoly(ethylenglykolether) _n
U	Unit
UV	Ultraviolett
V	Volt
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- -D-Galaktosid
<i>X. laevis</i>	<i>Xenopus laevis</i>

Genetischer Code

Erste Base (5'-Ende)	Zweite Base (Drei- und Einbuchstabencode für Aminosäuren)								Dritte Base (3'-Ende)
	U		C		A		G		
U	UUU	Phe-F	UCU	Ser-S	UAU	Tyr-Y	UGU	Cys-C	U
	UUC	Phe-F	UCC	Ser-S	UAC	Tyr-Y	UGC	Cys-C	C
	UUA	Leu-L	UCA	Ser-S	UAA	Stop	UGA	Stop	A
	UUG	Leu-L	UCG	Ser-S	UAG	Stop	UGG	Trp-W	G
C	CUU	Leu-L	CCU	Pro-P	CAU	His-H	CGU	Arg-R	U
	CUC	Leu-L	CCC	Pro-P	CAC	His-H	CGC	Arg-R	C
	CUA	Leu-L	CCA	Pro-P	CAA	Gln-Q	CGA	Arg-R	A
	CUG	Leu-L	CCG	Pro-P	CAG	Gln-Q	CGG	Arg-R	G
A	AUU	Ile-I	ACU	Thr-T	AAU	Asn-N	AGU	Ser-S	U
	AUC	Ile-I	ACC	Thr-T	AAC	Asn-N	AGC	Ser-S	C
	AUA	Ile-I	ACA	Thr-T	AAA	Lys-K	AGA	Arg-R	A
	AUG	Met [*] -M	ACG	Thr-T	AAG	Lys-K	AGG	Arg-R	G
G	GUU	Val-V	GCU	Ala-A	GAU	Asp-D	GGU	Gly-G	U
	GUC	Val-V	GCC	Ala-A	GAC	Asp-D	GGC	Gly-G	C
	GUA	Val-V	GCA	Ala-A	GAA	Glu-E	GGA	Gly-G	A
	GUG	Val-V	GCG	Ala-A	GAG	Glu-E	GGG	Gly-G	G

* AUG ist sowohl Initiationssignal als auch der Code für interne Met-Reste

Vorsätze im Dezimalsystem

Potenz	Vorsilbe	Kurzzeichen	Potenz	Vorsilbe	Kurzzeichen
10^{15}	Peta	P	10^{-15}	Femto	f
10^{12}	Tera	T	10^{-12}	Piko	p
10^9	Giga	G	10^{-9}	Nano	n
10^6	Mega	M	10^{-6}	Mikro	μ
10^3	Kilo	k	10^{-3}	Milli	m
10^2	Hekto	h	10^{-2}	Centi	c

1. Einleitung

Die großen Genomprojekte und die Aufgaben der post-genomischen Ära

Im Frühjahr 2001 publizierten das aus verschiedenen Arbeitsgruppen bestehende internationale Genomprojekt (Human Genome Project, HGP) sowie die Firma Celera unabhängig voneinander ihre Sequenzierungsergebnisse des menschlichen Genoms. Dieses ist etwa 3,2 Mrd. Basen groß und die vorhergesagte Genzahl liegt zwischen 39.114 (Celera; Venter et al. 2001) und 31.778 (HGP; Lander et al. 2001). Das Proteom des Menschen lässt sich in 1278 Proteinfamilien einteilen. 40 % der vorhergesagten Proteine lassen sich keiner bisher bekannten Proteinfamilie zuordnen und bilden eine große Gruppe unbekannter Proteine (**Abb. 1**). Unter den restlichen 60 % der Gene codieren 2.308 für Nucleinsäureenzyme, 1.850 für Transkriptionsfaktoren, 1.543 für Rezeptoren, 868 für Proteinkinasen, 577 für Zelladhäsionsmoleküle, 406 für Ionenkanäle und 350 für intrazelluläre Transportproteine.

Für membranäre Transportproteine codieren etwa 1,7 % aller Gene; dies entspricht einer Anzahl von 533 (Venter et al. 2001). Nach einer anderen Quelle codieren etwa 6 % aller humanen Gene (~2000 Gene) für Transportproteine, wobei weniger als die Hälfte davon bisher identifiziert wurden (Saier 2000).

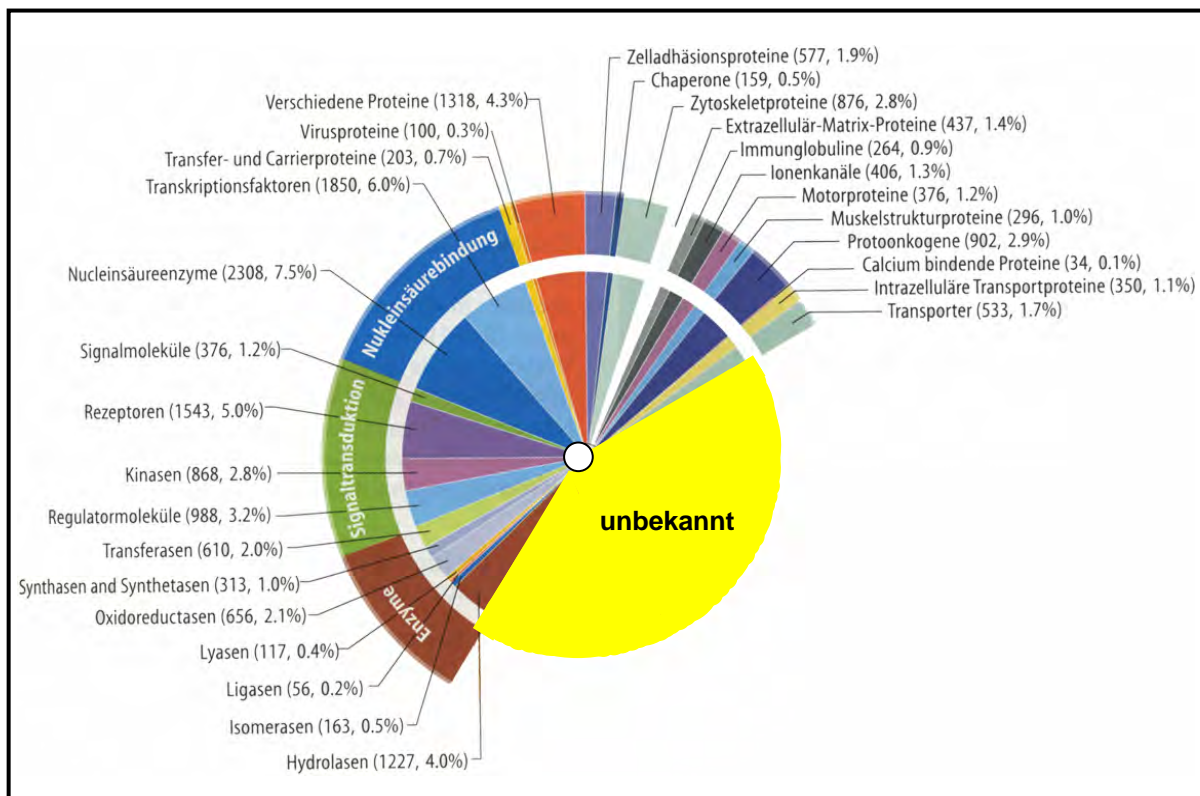


Abb. 1: Verteilung der molekularen Funktionen von 26.383 humanen Genen (nach Venter et al. 2001).

Die Genomprojekte liefern eine enorme Menge an Sequenzdaten, welche später entsprechend analysiert und zugeordnet werden müssen. Die Identifizierung, Klonierung und funktionelle Charakterisierung der großen Anzahl bisher unbekannter Proteine wird eine der größten Herausforderungen der post-genomischen Ära sein. Die vorliegende Arbeit trägt dazu bei. Sie befasst sich mit einer neuen Proteinfamilie, die mittels bioinformatischer Analysen identifiziert wurde und zur Klonierung von Proteinen geführt hat, deren Sequenzen weder bekannt noch zuvor untersucht worden waren.

2. Literaturübersicht

2.1 Grundlagen des Membrantransportes

Bereits vor 58 Jahren wurde die wichtige Rolle von Membrantransportprozessen in Bakterien erkannt (Mitchell 1949). Seitdem hat man große Fortschritte im Verständnis der molekularen Grundlagen des Membrantransportes und seiner Bedeutung für den Eintritt essentieller Nährstoffe in Zytoplasma und Organellen bzw. für den Efflux toxischer Substanzen und Stoffwechselendprodukten aus dem Zytoplasma gemacht. Der selektive Austausch von Substanzen über die Membranbarriere erlaubt es einer Zelle, Nährstoffe aus der Umgebung aufzunehmen, aber den Eintritt von toxischen Substanzen zu verhindern oder Stoffwechselendprodukte aus der Zelle auszuschleusen, aber die gewonnene Energie in der Zelle zu konzentrieren. Damit bilden die Prozesse des Membrantransportes über die Barriere der biologischen Membranen einen essentiellen Prozess zur Aufrechterhaltung der Homöostase von Zelle, Organ und Organismus (Hediger et al. 2004).

Da biologische Membranen vorwiegend aus Phospholipiden und Cholesterin zusammengesetzt sind, haben sie einen stark hydrophoben Charakter und bilden damit hauptsächlich eine Barriere für hydrophile polare oder geladene Moleküle. Streng genommen können aber alle Substanzen, unabhängig von ihrer hydrophilen oder hydrophoben Natur entlang ihres Konzentrationsgradienten die Membran über einfache Diffusion durchdringen. Die Geschwindigkeit dieser einfachen Diffusion hängt aber erheblich von der Lipophilie und der Molekülgröße der betreffenden Substanz ab. Während nämlich Gase wie O₂, CO₂, NO, N₂O und volatile Inhalationsnarkotika sowie lipophile Steroidhormone sehr schnell durch die Membran diffundieren können, stellt die Lipiddoppelschicht für polare (Glukose) oder geladene (Aminosäuren, Gallensäuren, Laktat) Moleküle eine erhebliche Diffusionsbarriere dar. Um den Austausch dieser Substanzen zwischen zwei Membranseiten zu ermöglichen, sind in die Membran zahlreiche Transportproteine, auch Carrier genannt, integriert. Diese erkennen verschiedene Substanzen aufgrund spezifischer physikochemischer und räumlich-struktureller Eigenschaften und verschaffen ihnen eine Passage durch das hydrophobe Membranmilieu.

2.2 Funktionelle Unterschiede von Membrantransportsystemen

In biologischen Systemen bilden Kanäle und Carrier die Familie der Membrantransportproteine. Die einfachste Form des Membrandurchtritts polarer und geladener Substanzen bzw. Ionen vermitteln Membrankanäle, bei denen die Moleküle (Ionen, Wasser) die Zellmembran durch wässrige Poren passieren. Im Gegensatz zu den Kanälen findet bei den Transportern eine Bindung zwischen Substrat und Transportprotein statt, in Folge derer das Transportprotein seine Konformation verändert und das Substrat durch die Zellmembran transportiert. Transportproteine

weisen eine Substrat-Spezifität und eine Sättigungskinetik auf. Das TC-System (*transporter classification system*) teilt Transportproteine nach der Art der Energetisierung in verschiedene Gruppen ein (**Abb. 2**) (Saier 2000).

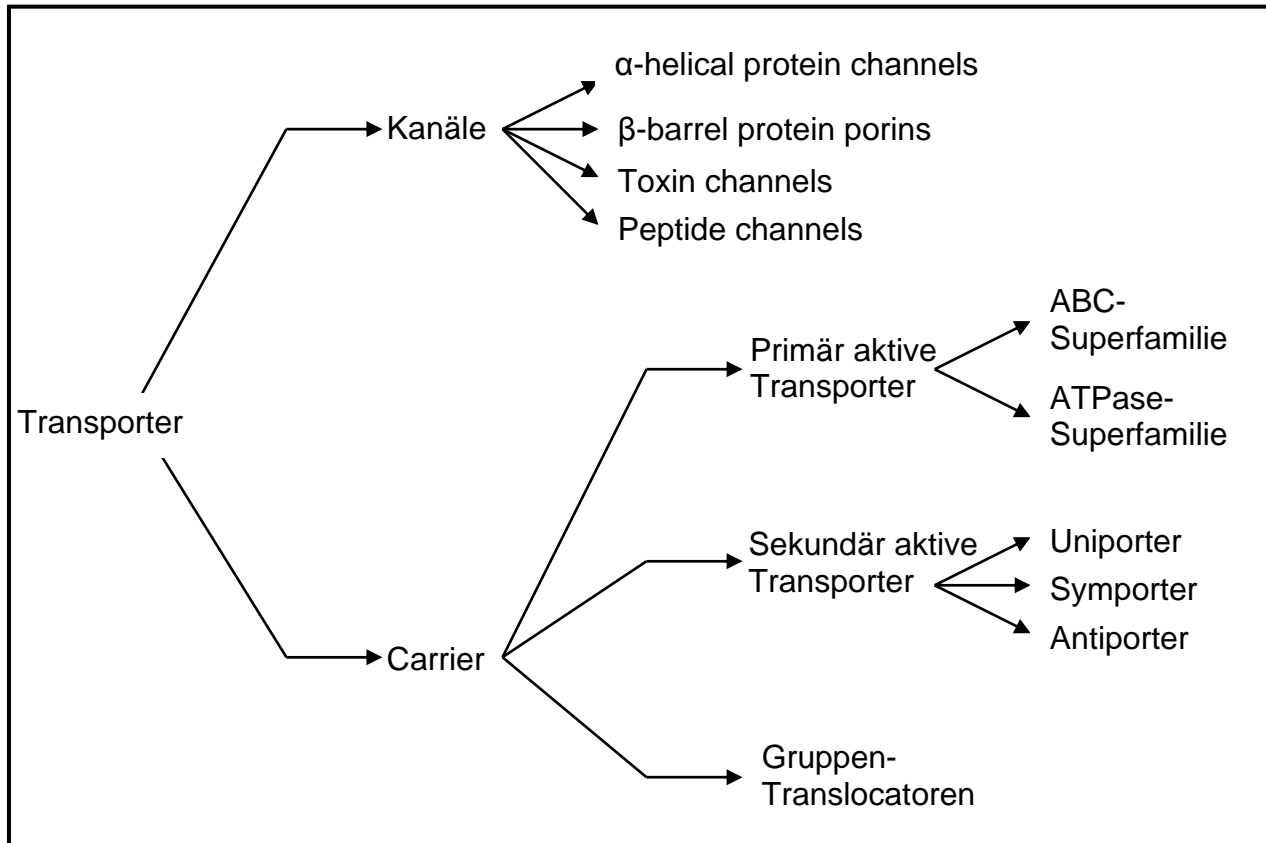


Abb. 2: Übersicht über Membrantransporter in biologischen Membranen nach dem TC-System (www.biology.ucsd.edu/~msaier/transport/ und www.tcdb.org). Die Transporter sind in zwei große Kategorien, Kanäle und Carrier, eingeteilt. Die Carrier werden nach der Energie-Kopplung in primär aktive Transporter (z.B. ABC- und ATPase-Superfamilien), sekundär aktive Transporter (Uniporter, Symporter und Antiporter), und die Familie der Gruppentranslocatoren zusammengefasst.

Nach diesem Kriterium wird ein Transporter als „primär“ activer Carrier betrachtet, wenn an den Transportprozess eine „primäre“ Energiequelle gekoppelt ist (z.B. eine chemische Reaktion, Lichtabsorption, Elektronenfluss). Zu den primär energieabhängigen Transportern gehört die Familie der ABC-Transporter (ATP-binding-cassette) (Borst und Elferink 2002) sowie die Ionentransport-ATPasen (Lingrel und Kuntzweiler 1994, Blanco und Mercer 1998). Bei einem „sekundär“ aktiven Transporter wird an die Reaktion „sekundär“ eine Energiequelle gekoppelt (z.B. ein ionischer elektrochemischer Gradient wie die „proton motive force“, PMF und die „sodium motive force“, SMF), welche von einer primären Energiequelle generiert wurde (z.B. Na^+/K^+ -ATPase). Unter den sekundär aktiven Transportern spricht man von Uniportern, wenn der Transport unabhängig von anderen Substanzen läuft und von dem Transportprotein ein einziges Molekül transportiert wird. Im Gegensatz dazu werden bei den Symportern, oder Cotransportern,

zwei oder mehr Moleküle gleichzeitig in die gleiche Richtung transportiert. Um einen Antiporter handelt es sich, wenn verschiedene Moleküle entgegengesetzt transportiert werden (Saier 2000).

2.3 Die Superfamilie der Solute Carrier (SLC)

Das Human Gene Nomenclature Committee (HGNC) der Human Genome Organisation (HUGO) führt eine Liste von Transporterfamilien, welche unter dem Begriff Solute Carrier Superfamilie (SLC) zusammengefasst werden. SLC-Transporter umfassen passive Transporter sowie ionengekoppelte Symporter und Antiporter, welche entweder in der Zellmembran oder intrazellulär sitzen. Die SLC-Superfamilie besteht derzeit aus 46 Familien (SLC1 bis SLC46) mit insgesamt 360 Genen von Menschen, Ratte und Maus (Hediger et al. 2004). Ein neu klonierter Transporter wird dabei einer bestimmten SLC-Familie zugeordnet, wenn er mindestens 20-25 % Sequenzhomologie zu bereits bekannten Mitgliedern dieser Familie hat. Die Bezeichnung jedes Transportergens beginnt dabei mit dem Symbol SLC gefolgt von der Nummer der jeweiligen Transporterfamilie. **Tabelle 1** zeigt eine Auswahl der bisher bekannten SLC-Familien. Jedes einzelne Transportergen wird innerhalb jeder Familie chronologisch zur Erstklonierung durchnummeriert. Dabei steht zwischen der Gennummer und dem Symbol der Transporterfamilie ein „A“, um die Zahlenfolge zu unterbrechen (z.B. SLC2A4) (Hediger et al. 2004)

2.4 Die Familie der Sodium Bile Acid Symporter (SBF)

Proteinfamilien werden als Gruppe von Molekülen definiert, die eine signifikante Sequenzidentität aufweisen. Familienmitglieder können auch eine ähnliche biochemische Funktion ausüben. Allerdings zeigen nicht alle Mitglieder einer Proteinfamilie das gleiche Transportverhalten. So wurde z.B. in der SLC10-Familie, seit vielen Jahren als „Familie der Gallensäuretransporter“ bezeichnet, ein neues Mitglied entdeckt, der *Sodium-dependent Organic Anion Transporter* (SOAT), welcher keine Gallensäuren, sondern sulfatierte Steroidhormone transportiert (Geyer et al. 2004). Andererseits werden täglich viele vorausgesagte Sequenzen in den Sequenzdatenbanken (GenBank/EBI/DDBJ) nur aufgrund ihrer Sequenzhomologie zu bereits bekannten Sequenzen eingetragen. Dies kann zu einer falschen Voraussage der Proteinfunktion führen, wie am Beispiel des SOAT gezeigt wurde.

Nahe verwandte Proteine zeigen meist eine charakteristische Domänen-Struktur, welche als eine Art „evolutionärer Fingerabdruck“ in verschiedenen Mitgliedern einer Proteinfamilie zu finden ist (Geer et al. 2002). Wenn man davon ausgeht, dass diese Domänen für die Funktion der Proteine sehr wichtig waren, erklärt sich die hohe Konservierung der Domänen-Sequenzen. Es existieren verschiedene Sequenz-Datenbanken, welche Proteine gezielt nach bestimmten Domänen-Strukturen einteilen. Zu diesen zählen Pfam (*Protein family database*, Bateman et al. 2004),

SMART (*Simple Modular Architecture Research Tool*, Letunic et al. 2002) und CDD (*Conserved Domain Database*, Marchler-Bauer et al. 2005).

Tab. 1: Auszug aus der Liste der SLC-Transporterfamilien entsprechend dem HUGO Nomenclature Committee (modifiziert aus www.bioparadigms.org/slc).

Familie	Familie der... / Transporterfamilie für...	Anzahl humane Gene
SLC1	Glutamat und neutrale Aminosäuren	7
SLC2	Glukose (GLUT-Familie)	14
SLC4	Bikarbonat	10
SLC5	Na ⁺ /Glukose-Cotransporter	8
SLC6	Neurotransmitter (Na ⁺ - und Cl ⁻ -abhängig)	16
SLC8	Na ⁺ /Ca ⁺⁺ -Austauscher	3
SLC9	Na ⁺ /H ⁺ -Austauscher	8
SLC10	Na ⁺ /Gallensäuren-Cotransporter	5
SLC14	Harnstoff	2
SLC15	H ⁺ /Oligopeptid-Cotransporter	4
SLC16	Monocarboxylate	14
SLC19	Folat und Thiamin	3
SLC21/SLCO	Organische Anionen (OATP-Familie)	11
SLC22	Organische Anionen / Organische Kationen	18
SLC23	Vitamin C (Na ⁺ -abhängig)	4
SLC27	Fettsäuren	6
SLC28	Nukleoside (Na ⁺ -abhängig)	3
SLC31	Kupfer	2
SLC33	Acetyl-CoA	1
SLC36	Aminosäuren (H ⁺ -abhängig)	4
SLC38	Neutrale Aminosäuren (System A und N)	6
SLC40	Eisen	1
SLC43	Aminosäuren (Na ⁺ -unabhängig)	2

Bei der Pfam Datenbank handelt es sich um eine Sammlung multipler Sequenz-Alignments von Protein-Domänen bzw. Proteinfamilien. Im Mai 2006 besteht Pfam aus 8.296 Proteinfamilien. Die Pfam Datenbank ermöglicht es nicht nur neue Sequenzen mit schon klassifizierten Proteinfamilien zu vergleichen, sondern auch nach einer bestimmten Domänen-Architektur zu suchen. In der Pfam Datenbank wird die SBF-Domäne der *Sodium Bile Acid Symporter Family* geführt und als eigene Proteinfamilie beschrieben (SBF-Familie, Pfam PF01758). Die SBF-Domäne ist in den Mitgliedern der SLC10-Familie enthalten. Die SLC10-Mitglieder NTCP und ASBT¹ waren dabei namensgebend für die gesamte SBF-Familie. Die SBF-Domäne wurde aber auch in Proteinen von Prokaryonten identifiziert. Die SBF-Familie umfasst derzeit mehr als 490 Proteine, welche alle die SBF-Domäne-Architektur gemeinsam haben. Innerhalb der SBF-Familie sind bisher zwei SBF-Subfamilien bekannt: Die bereits genannte *Solute Carrier Family 10* (SLC10) und die Familie der

¹ Die Namen ASBT (*Apical Sodium-dependent Bile Acid Transporter*) und ISBT (*Ileal Sodium-dependent Bile Acid Transporter*) werden in dieser Arbeit gleichwertig verwendet.

Arsenical Resistance Carrier (ACR3). Nur die SLC10-Familie enthält Proteine von Wirbeltieren, während in der ACR3-Familie bisher nur Proteine von Bakterien und Hefen bekannt sind.

2.5 Die Solute Carrier-Familie 10 (SLC10)

Die Solute Carrier Familie-10 (SLC10) enthält zwei natriumabhängige Gallensäuretransporter, das „Na⁺/Taurocholate Cotransporting Polypeptide“ (NTCP; *SLC10A1*²) und den „Apical Sodium-dependent Bile Acid Transporter“ (ASBT; *SLC10A2*). Beide Transporter sind essentiell an der Aufrechterhaltung des enterohepatischen Kreislaufs der Gallensäuren beteiligt. Aber nicht alle Mitglieder der SLC10-Familie sind Gallensäuretransporter: Der „Sodium-dependent Organic Anion Transporter“ (SOAT; *SLC10A6*) transportiert sulfatierte Steroide aber keine Gallensäuren.

Tab. 2: Mitglieder der SLC10-Familie. Aufgeführt sind nur die humanen Gene.

Gen	Protein	Expression	Substrate	Chr.	Datenbank
<i>SLC10A1</i>	NTCP	Leber (basolaterale Membran) und Pankreas (Tubuli)	Gallensäuren, sulfatierte Steroide	14q24	NM_003049
<i>SLC10A2</i>	ASBT	Ileum (apikale Membran), Niere (proximaler Tubulus) und Cholangiozyten (apikale Membran)	Gallensäuren	13q33	NM_000452
<i>SLC10A3</i>	P3	Ubiquitär (nach EST-Daten)	Unbekannt	Xq28	NM_019848
<i>SLC10A4</i>	P4	Cholinerge Neurone	Unbekannt	4p12	NM_152679
<i>SLC10A5</i>	P5	Fetales Gehirn, Leber	Unbekannt	8q21	NM_001010893
<i>SLC10A6</i>	SOAT	Hoden, Plazenta, Nebenniere	Sulfatierte Steroide	4q21	NM_197965

2.5.1 Der natriumabhängige Gallensäuretransporter der Leber NTCP

Ntcp wurde als erstes Mitglied der SLC10-Familie mittels Expressionsklonierung aus polyA⁺-RNA der Rattenleber isoliert (Hagenbuch et al. 1990, 1991). In den folgenden Jahren wurden weitere Orthologe von Mensch (Hagenbuch et al. 1994), Maus (Cattori et al. 1999) und Kaninchen (Kramer et al. 1999) kloniert. Der NTCP des Menschen³ besteht aus 349 Aminosäuren, der Ntcp von Ratte und Maus aus 362 Aminosäuren. Diese Proteine zeigen eine Sequenzidentität von 73 %. NTCP/Ntcp wird spezifisch in der basolateralen (sinusoidalen) Membran von Hepatozyten exprimiert (Stieger et al. 1994; Ananthanarayanan et al. 1994). Er vermittelt einen Natrium-gekoppelten Transport von Taurocholat und anderen Gallensäuren in einem Natrium:Taurocholat-Verhältnis von 2:1 (Hagenbuch und Meier 1996; Weinman 1997). Ntcp ist der wichtigste Taurocholat-Aufnahmetransporter in der basolateralen Membran von Ratten-Hepatozyten (Trauner

² In dieser Arbeit werden Abkürzungen von Gennamen kursiv geschrieben

³ Für die humanen Proteine hat sich die Bezeichnung in Großbuchstaben, für die tierischen Proteine in Kleinbuchstaben eingebürgert.

und Boyer 2003; Kullak-Ublick et al. 2004). NTCP/Ntcp transportiert nicht nur Gallensäuren, sondern auch die sulfatierten Steroide Estron-3-sulfat und Dehydroepiandrosteronsulfat (DHEAS), das Leberdiagnostikum Bromosulphophthalein und das Arzneistoffkonjugat Chlorambucil-Taurocholat (Kullak-Ublick et al. 1997; Craddock et al. 1998; Schroeder et al. 1998; Kullak-Ublick et al. 2000; Hata et al. 2003). Die NTCP/Ntcp-Gene von Mensch, Ratte und Maus sind auf den Chromosomen 14p24, 6q24 und 12C3 lokalisiert (Hagenbuch und Meier 1994; Cohn et al. 1995; Green et al. 1998).

2.5.2 Der natriumabhängige Gallensäuretransporter des Dünndarms ASBT

Der Gegenspieler des hepatischen NTCP im Ileum ist der ASBT. Dieser Gallensäuretransporter wurde aus einer intestinalen cDNA-Bibliothek des Hamsters durch Expressionsklonierung isoliert (Wong et al. 1994). In den folgenden Jahren erfolgte die Klonierung des humanen ASBT (Wong et al. 1995), des Asbt der Ratte (Shneider et al. 1995), des Asbt des Kaninchens (Kramer et al. 1999) und des Asbt der Maus (Saeki et al. 1999), jeweils aus dem Ileum. ASBT/Asbt aller genannten Spezies bestehen aus 348 Aminosäuren. Zwischen den Spezies besteht eine Sequenzidentität von 80 %. Jedoch ist die Sequenzidentität zwischen ASBT und NTCP ziemlich niedrig und beträgt nur 35 %. Ähnlich wie der NTCP so transportiert auch der ASBT alle physiologisch vorkommenden konjugierten Gallensäuren mit hoher Affinität (Wong et al. 1994, 1995; Craddock et al. 1998). Der Transportmechanismus des ASBT ist elektrogen und zeigt wie der NTCP eine 2:1 Kopplung seiner Cosubstrate Gallensäure und Natrium (Weinman et al. 1998). Im Gegensatz zur basolateralen Lokalisation des NTCP wird der ASBT in der apikalen Bürstensaummembran der Enterozyten im terminalen Ileum exprimiert (Shneider et al. 1995). Intrazellulär ist der ASBT mit dem cytoplasmatischen „Ileal Lipid Binding Protein“ ILBP gekoppelt, welches die resorbierten Gallensäuren von der apikalen zur basolateralen Membrandomäne der Enterozyten transferiert (Kramer et al. 1997, 2001a,b). Die funktionelle Bedeutung des ASBT im Dünndarm wird durch verschiedene Mutationen im ASBT-Gen deutlich, welche zu einem Funktionsverlust des Transporters führen und dadurch eine Gallensäuremalabsorption, eine Unterbrechung des enterohepatischen Kreislaufs von Gallensäuren sowie eine Reduzierung des Plasma-LDL-Cholesterinspiegels bedingen (Wong et al. 1995; Oelkers et al. 1997). Auch bei *Slc10a2*^{-/-} Knockout-Mäusen wurde eine intestinale Gallensäuremalabsorption und eine gesteigerte fäkale Gallensäureausscheidung beobachtet (Dawson et al. 2003). Die ASBT/Asbt-Gene von Mensch, Ratte und Maus sind auf den Chromosomen 13q13, 16q12 und 8A1 lokalisiert (Wong et al. 1996).

2.5.3 Der natriumabhängige Steroidsulfattransporter SOAT

Vor zwei Jahren wurde am Institut für Pharmakologie und Toxikologie ein völlig neuer Transporter der SLC10-Familie kloniert und als *Sodium-dependent Organic Anion Transporter* SOAT bezeichnet (Geyer et al. 2004). SOAT/Soat von Mensch, Ratte und Maus besteht aus 370-377

Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von 40.3-41 kDa. In seiner Länge ist er damit sehr ähnlich zu NTCP/Ntcp (349-362 Aminosäuren) und ASBT/Asbt (348 Aminosäuren). SOAT hat 70 % Proteinsequenzidentität zum ASBT, aber nur 42 % Proteinsequenzidentität zum NTCP. Darüber hinaus sind SOAT und ASBT die phylogenetisch am nächsten verwandten Transporter der SLC10-Familie (Geyer et al. 2006). SOAT transportiert im Gegensatz zu NTCP und ASBT keine Gallensäuren und ist daher ein außergewöhnliches Mitglied der SLC10-Familie. SOAT transportiert aber spezifisch die sulfatierten Steroide Estron-3-sulfat, Dehydroepiandrosteronsulfat und Pregnenolonsulfat (Geyer et al. 2004, Geyer et al. 2006). Aufgrund dieser Transportfunktion kommt dem SOAT vermutlich eine wichtige Rolle beim Transport sulfatierter Steroide in endokrinologisch relevanten Geweben wie Hoden, Plazenta und Nebennieren zu.

2.6 Die Familie der ACR3-Carrier

Die zweite SBF-Subfamilie wird als ACR3-Familie bezeichnet. Mitglieder dieser Familie vermitteln in Bakterien und Hefen einen Arsenit-resistenten Phänotyp. Der Mechanismus dieser Resistenz beruht auf einem Efflux-Transport, durch welchen Arsenit aus der Zelle ausgeschleust wird (Rosen 1999). Arsenhaltige Verbindungen sind giftige Substanzen, welche in der Umwelt sowohl aus geologischen Quellen aber auch im Zuge der zunehmenden Umweltverschmutzung reichlich vorhanden sind. Das pentavalente Anion Arsenat (As(V)) ist ein Phosphat-Analog, welches mit Phosphorylierungsreaktionen interferiert (Chang et al. 1989). Viel toxischer für Zellen ist allerdings Arsenit, das trivalente Molekül (As(III)), welches mit Cysteinen reagiert und damit die Struktur und Funktion von Proteinen verändern kann (Rosen et al. 1995). Weiterhin wirkt Arsenit als Mutagen durch Hemmung der DNA-Reparatur und Induktion der Gen-Amplifikation (Rossman und Wang 1999).

Zwei Mitglieder der ACR3-Familie sind funktionell charakterisiert worden. Das *ACR3*-Gen von *Saccharomyces cerevisiae* befindet sich in einem Cluster von drei Genen: *ACR1*, *ACR2*, *ACR3* (Bobrowicz et al. 1997). Das Protein-Produkt von *ACR3* (Acr3p) bedingt die Resistenz gegen hohe Arsenit-Konzentrationen aber nicht gegen Arsenat. Das Produkt des *ACR2*-Gen ist ein Protein von 130 Aminosäuren (Acr2p) mit einem Molekulargewicht von 14,9 kDa, das nach Computer-Analyse keine Transmembrandomänen besitzt (Bobrowicz et al. 1997). Später wurde erkannt, dass Acr2p als eine spezifische Arsenat-Reduktase wirkt (Mukhopadhyay et al. 2000), deren Anwesenheit bei der Resistenz-Erzeugung eine essentielle Rolle spielt (siehe **Abb. 3**).

Wysocki et al. (1997) haben gezeigt, dass bei Überexpression beider Gene, *ACR2* und *ACR3*, die Resistenz gegen Arsenat erweitert wird. *ACR3* codiert für ein Membranprotein von 45,8 kDa (Acr3p), welches aus 404 Aminosäuren besteht und 10 vorausgesagte Transmembrandomänen aufweist (Wysocki et al. 1997). Untersuchungen an *ACR3* Knockout- Stämmen von *S. cerevisiae*

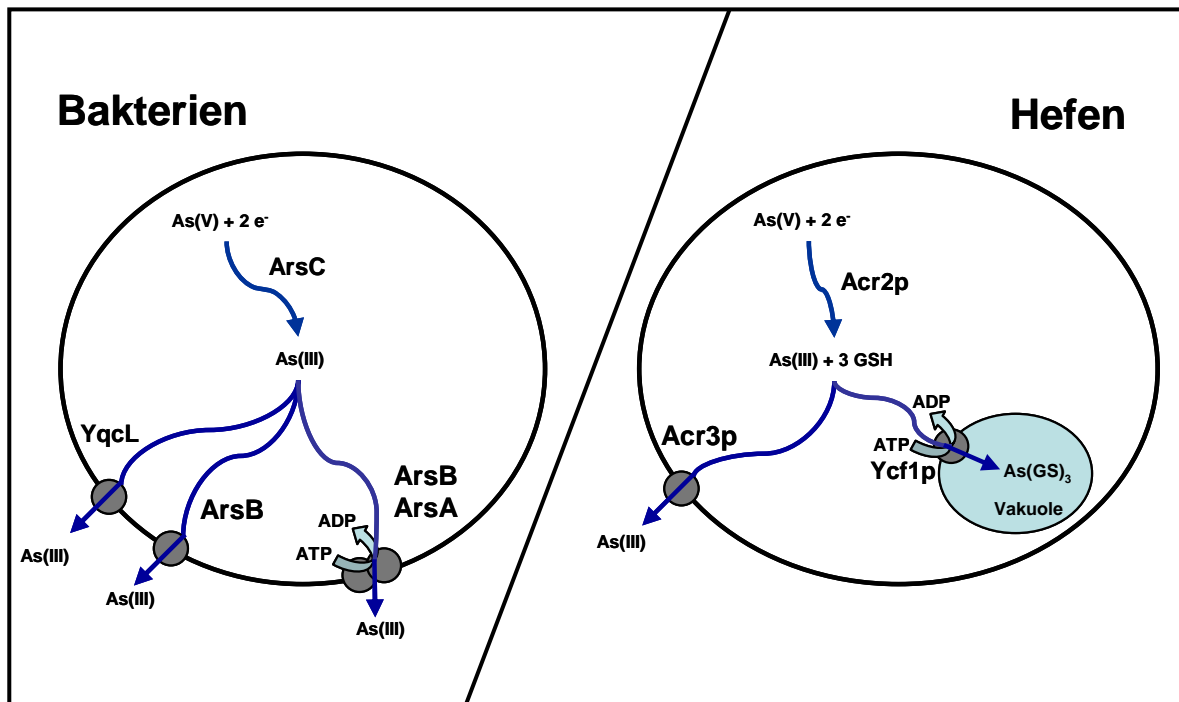


Abb. 3: Mechanismen der Arsen-Resistenz in Prokaryonten (*B. subtilis*) und Eukaryonten (*S. cerevisiae*). As(V) : Arsenat; As(III) : Arsenit. Weitere Begriffe werden im Text erläutert.

zeigten, dass die *ACR3*-Mutanten 5fach empfindlicher gegenüber Arsenit und Arsenat reagierten als die Wildtyp-Hefen (Wysocki et al. 1997). Die Aminosäuresequenz von *Acr3p* zeigt eine sehr hohe Sequenzidentität von 36,7 % zu dem *ArsB* Protein von *B. subtilis*, das zweite identifizierte Mitglied der *ACR3*-Familie (Bobrowicz et al. 1997). *ArsB*, auch *ORF1* (*Open reading frame 1*) genannt, wurde in dem *ars*-Operon (*arsenical resistance*) des sog. *skin*-Elements (*sigK intervening element*) von *B. subtilis* gefunden. Das *ars*-Operon besteht aus insgesamt vier Leserahmen: *arsR*, *ORF2*, *arsB* (*ORF1*) und *arsC*. *ArsB* codiert für ein Protein mit 10 Transmembrandomänen und vermittelt durch einen Efflux eine Resistenz gegen Arsenit (Sato und Kobayashi 1998).

Abgesehen von der Proteinidentität und Membrantopologie beider *ACR3*-Carrier sind in den Mechanismen der Arsenit-Resistenz von Prokaryonten und Eukaryonten einige Unterschiede zu finden (siehe **Abb. 3**). Am ersten Schritt der Arsen-Entgiftung ist eine Metalloreduktase beteiligt. In *S. cerevisiae* handelt es sich um das 14,9 kDa *Acr2p* Protein, das Produkt des *ACR2*-Gens. In *B. subtilis* wird diese Funktion von *ArsC*, welches von dem vierten Gen (*arsC*) des *ars*-Operons codiert wird, übernommen (Rosen 1999). Beide Arsenat-Reduktasen setzen Arsenat (As(V)) in Arsenit (As(III)) um und verwenden wahrscheinlich Glutathion als Elektronenquelle. Nur Arsenit (As(III)) kann in das extrazelluläre Milieu zurücktransportiert werden. *B. subtilis* besitzt zwei Arsenit-Transporter: einer ist der oben genannte *ACR3*-Carrier *ArsB* und der zweite ist das *YqcL*-Protein. *YqcL* wird von dem dritten Gen des zweiten *ars*-Operons codiert. Obwohl beide Carrier Membranproteine sind und den gleichen Efflux-Transport ausüben, ist das *YqcL*-Protein kein Carrier der *ACR3*-Familie. Weiterhin wurden im *ars*-Operon von Gram-negativen Bakterien zwei

zusätzliche Gene identifiziert, *arsD* und *arsA*. *ArsA* stellt einen evolutionären Vorteil dar, denn sein Genprodukt bildet gemeinsam mit *ArsB* eine ATP-getriebene Arsenit-Efflux-Pumpe (Dey und Rosen 1995). In Hefen existieren zwei Wege der Arsenit-Resistenz. Neben dem sekundären Acr3p-Carrier ist *S.cerevisiae* auch in der Lage, Arsenit in der Vakuole zu speichern. Dies erfolgt über den ABC-Carrier Ycf1p (*y*east *c*admium *r*esistance *f*actor 1), welcher das Glutathion-konjugierte Arsenit erkennt und in die Vakuole transportiert (Rosen 1999).

2.7 Zielsetzung der Arbeit

Seit der Entdeckung von NTCP und ASBT am Anfang der 1990er Jahre galt die SLC10-Transporterfamilie als die Familie der „natriumabhängigen Gallensäuretransporter“ (Hagenbuch und Dawson 2004). In den letzten zwei Jahren wurden am Institut für Pharmakologie und Toxikologie weitere Mitglieder dieser Transporterfamilie identifiziert, welche als P3 (*SLC10A3*), P4 (*SLC10A4*) und P5 (*SLC10A5*) bezeichnet wurden (Geyer et al. 2006). Ein weiteres Mitglied, SOAT (*SLC10A6*), wurde ebenfalls am Institut für Pharmakologie und Toxikologie kloniert und bereits funktionell charakterisiert (Geyer et al. 2004). Mit seiner Klonierung wurde offensichtlich, dass nicht alle Mitglieder der SLC10-Familie Gallensäuretransporter sind.

Parallel zur Entdeckung von *SLC10A4* bis *SLC10A6* wurde eine weitere Familie bisher unbekannter Proteine identifiziert und kloniert, welche zunächst als P7-Familie bezeichnet wurde, da sie als 7. Unterfamilie (nach P3 bis P6) mit einer SBF-Domäne gefunden wurde (**Abb. 4**). Die P7-Proteine zeigten aber keine Sequenzhomologie zu einer bisher etablierten Proteinfamilie und hatten nur eine geringe Sequenzidentität von < 15 % zu den Mitgliedern der SLC10-Familie. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die P7-Proteine von Menschen, Ratte, Maus und Frosch zu klonieren, molekular und funktionell zu charakterisieren und phylogenetisch zu klassifizieren.

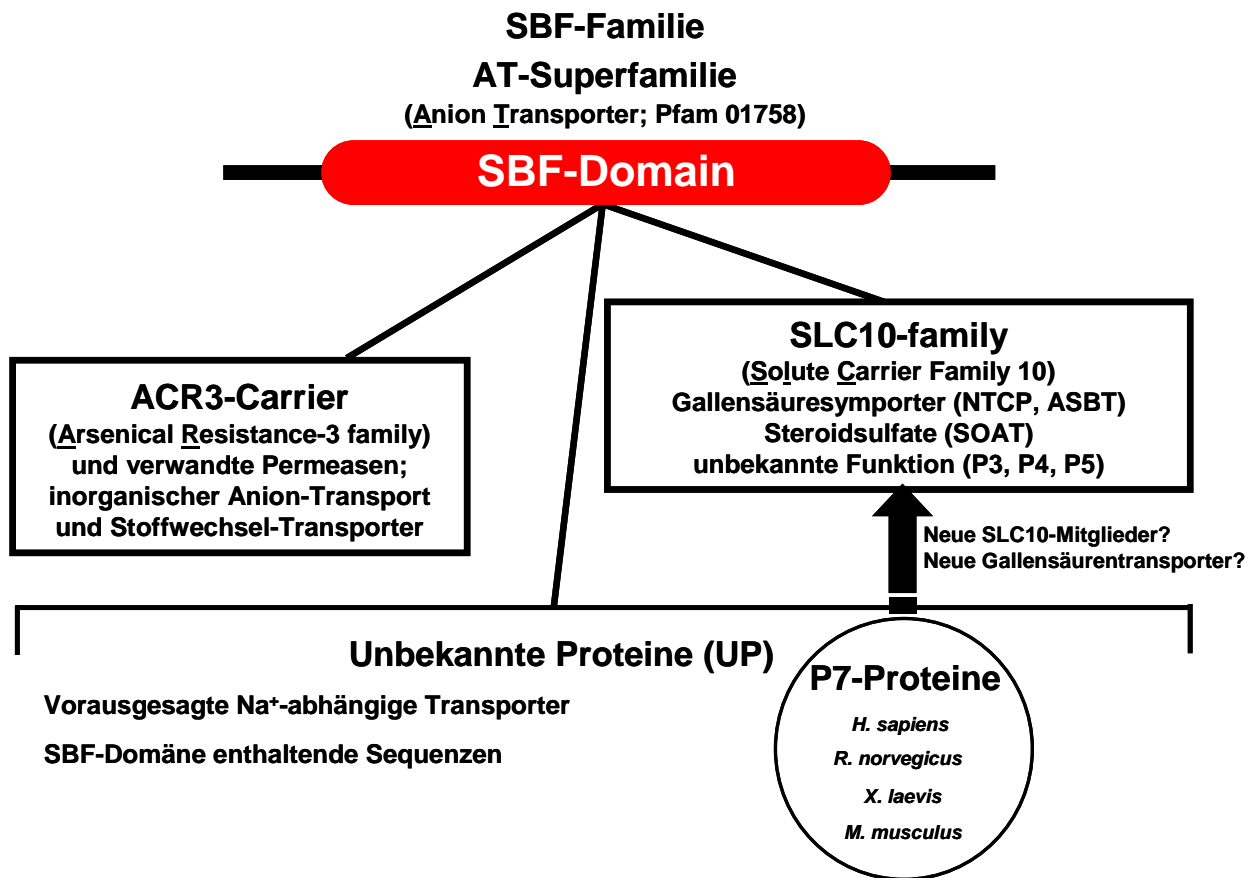


Abb. 4: SBF-Domäne enthaltende Proteine. Neben den SLC10- und ACR3-Carriern existieren zahlreiche Sequenzen von Bakterien und Eukaryonten, welche ebenfalls die SBF-Domäne enthalten und in der GenBank als Gallensäure/Na⁺-Symporter eingetragen sind. Die P7-Proteine von Menschen, Ratte, Maus und Frosch gehören zu dieser Gruppe bisher unbekannter SBF-Proteine. Sie wurden im Jahr 2003 am Institut für Pharmakologie und Toxikologie entdeckt und im Rahmen dieser Arbeit kloniert, charakterisiert und phylogenetisch klassifiziert.

3. Material

3.1 Verwendete Primer

Sequenzierungsprimer

Target (Spezies)	Bezeichnung	T _m (°C)	Sequenz (5'→3')
pBluePolyA	pBluePolyA-R	54,0	GAA AAA TGA CCC TTG AAA GAC
	Oatp2ratF1	57,3	TGA CCA TGA TTA CGC CAA GC
	FLAG-R	54,5	CTT ATC GTC GTC ATC CTT G
pGEM-T	pGEMT-R	55,9	TAC TCA AGC TAT GCA TCC AAC
	Oatp2ratR1	57,3	ATA CGA CTC ACT ATA GGG CG
pcDNA9	CMV-F		CGC AAA TGG GCG GTA GGC GTG
	BGH-R		TAG AAG GCA CAG TCG AGG

Primer für Expressionsprofile (RT-PCR)

Target (Spezies)	Bezeichnung	T _m (°C)	Sequenz (5'→3')
GAPDH (Ratte, Mensch, Maus)	G3PDH-F2	60,3	CAT CAA GAA GGT GGT GAA GCA G
	G3PDH-F1	61,4	ACG GGA AGC TCA CTG GCA TG
	G3PDH-R3	61,0	CGC CTG CTT CAC CAC CTT C
	G3PDH-R4	61,4	CCA CCA CCC TGT TGC TGT AG
GAPDH (Frosch)	XLG3PDH-F	66,0	GGT GCC AAG CGT GTC GTT ATC
	XLG3PDH-R	66,0	GTC AGT GGA GAC AAC CTG GTC
P7 (Mensch)	P7A-F1	66,0	GCT GGA GAG AAT GAG GAA AGA C
	P7A-R1	68,0	AGC TTC ACT CCC TTC TGC CTT G
	P7A-F2	64,0	CCA CTG AAG CCA GAA ATA ACT G
	P7A-R2	64,0	ATG ATG AGA GGA ACC ACA ACA G
P7 (Maus)	mrP7-F	66,0	GAA TGG TTC ATG GTC GGG ATA G
	mrP7-R	68,0	TCT GCT GGT GTG AAC CCC GAG
P7 (Frosch)	xP7-F	68,0	AAA CTG GAA CCT ACC GTG GGA G
	xP7-R	68,0	AGG GTG AGG GAC TTG TGT GTT G

Klonierungsprimer

Target (Spezies)	Bezeichnung	T _m (°C)	Sequenz (5'→3')
P7 (Mensch)	P7-F-SacII	67,5	CCA CCC GCG GTA ACA AAT ATG AGA CTG CTG
	P7-R-XbaI	65,3	AGT CTA GAT CCT TTG TTA CAC CGT CGG CCT TG
	P7-T/A-F	64,0	ATG AGG CTG CTG GAG AGA ATG
	P7-T/A-R	62,0	TTA TAC TGT CGG CCT TGT CAG
P7 (Maus)	mP7-F-SacII	70,9	CCA CCC GCG GTA ACA AAT ATG AGA CTG CTG
	mP7-R-XbaI	70,1	CCT CTA GAG TCA CAC TGT CGG CCT TGT C
P7 (Ratte)	rP7-F-SacII	68,0	CCA CCC GCG GAT GAG GCT GCT GGA GAG GGT G
	rP7-R-XbaI	66,0	CCT CTA GAT CAC ACT GTT GGC CTC GTC AG
P7 (Frosch)	xP7-F-SacII	70,5	CGG ACC GCG GTG TCA AGA TGG GCC TGC
	xP7-R-XbaI	69,0	TCT CTA GAC CCT GCT GTT ACA ACG GAA TCT TCG GC
	xP7-T/A-F	68,0	ATG GGC CTG CTG GAG AGA CTG
	xP7-T/A-R	64,0	TGT TAT AAT GGA ATC TTC GGC TG

Primer für die gerichtete Mutagenese zur Insertion des FLAG-Motivs

Target (Spezies)	Bezeichnung	Sequenz (5'→3')
P7 (Mensch)	P7-FLAG-F	GCT GAC AAG GCC GAC AGT AGA TTA CAA GGA TGA CGA CGA <u>TAA GTA AAA TCC CGC GGT GG</u>
	P7-FLAG-R	CCA CCG CGG GAT TTT ACT TAT CGT CGT CAT CCT TGT AAT <u>CTA CTG TCG GCC TTG TCA GC</u>
P7 (Ratte)	rP7-FLAG-F	GAC GAG GCC AAC AGT GGA TTA CAA GGA TGA CGA CGA TAA <u>GTG ATC TAG AGA CGA AGG AGG GTG</u>
	rP7-FLAG-R	CAC CCT CCT TCG TCT CTA GAT CAC TTA TCG TCG TCA TCC <u>TTG TAA TCC ACT GTT GGC CTC GTC</u>
P7 (Maus)	mP7-FLAG-F	CAA GGC CGA CAG TGG ATT ACA AGG ATG ACG ACG ATA AGT <u>GAC TCT AGA GAC GAA GGA GGG TG</u>
	mP7-FLAG-R	CAC CCT CCT TCG TCT CTA GAG TCA <u>CTT ATC GTC GTC ATC</u> <u>CTT GTA ATC CAC TGT CGG CCT TG</u>
P7 (Frosch)	xP7-FLAG-F	GGC AGC CGA AGA TTC CAT TAG ATT ACA AGG ATG ACG ACG <u>ATA AGT AAC AAA TCC CGC GGT GG</u>
	xP7-FLAG-R	CCA CCG CGG GAT TTG TTA <u>CTT ATC GTC GTC ATC CTT GTA</u> <u>ATC TAA TGG AAT CTT CGG CTG CC</u>

Die unterstrichenen Basen bilden das spätere FLAG-Motiv

Primer für die gerichtete Mutagenese zur Insertion des HA-Motivs

Target (Spezies)	Bezeichnung	Sequenz (5'→3')
P7 (Mensch)	P7-HA1-F	CAT AGG GGT GAA TGG <u>GTA CCC CTA CGA CGT CCC CGA CTA</u> <u>CGC CGG ACC ACT GAA GCC AG</u>
	P7-HA1-R	CTG GCT TCA GTG GTC <u>CGG CGT AGT CGG GGA CGT CGT AGG</u> <u>GGT ACC CAT TCA CCC CTA TG</u>
	P7-HA2-F	GAT CGT GTT TGC AGG CTA <u>CCC CTA CGA CGT CCC CGA CTA</u> <u>CGC CCA TGA GCATCT CTC</u>
	P7-HA2-R	GAG AGA TGC TCA TGG GCG TAG TCG GGG GAC GTC GTA GGG <u>GTA GCC TGC AAA CAC GAT C</u>
P7 (Ratte)	rP7-HA1-F	CGG TCG GAG TGA ACG GGT ACC CCT ACG ACG TCC CCG <u>ACT ACG CCG GAC CAC TGA AGC CA</u>
	rP7-HA1-R	TGG CTT CAG TGG TCC <u>GGC GTA GTC GGG GAC GTC GTA GGG</u> <u>GTA CCC GTT CAC TCC GAC CG</u>
	rP7-HA2-F	TAG TGT TTG CCG GCT <u>ACC CCT ACG ACG TCC CCG ACT ACG</u> <u>CCC ATG AGC ATC TCT CGC TG</u>
	rP7-HA2-R	CAG CGA GAG ATG CTC ATG <u>GGC GTA GTC GGG GAC GTC GTA</u> <u>GGG GTA GCC GGC AAA CAC TA</u>

Die unterstrichenen Basen bilden das spätere HA-Motiv

Primer für die Subklonierung in den Vektor pcDNA9

Target (Spezies)	Bezeichnung	Sequenz (5'→3')
P7 (Mensch)	P7-SK-F-KpnI	GGC GGT ACC ACT AAT GAG GCT GCT GG
	P7-SK-R-XhoI	CAC CTC GAG ATT TTA CTT ATC GTC G
P7 (Ratte)	rP7-SK-F-KpnI	TGG GGT ACC ACC GCG GAT GAG GCT G
	rP7-SK-R-XhoI	AGT CTC GAG ATC ACT TAT CGT CGT C

Primer zur Kontrolle der FLAG- und HA-Insertion

Spezies	Bezeichnung	Sequenz (5'→3')
<i>alle</i>	K_FLAG_R	CTT ATC GTC GTC ATC CTT G
<i>alle</i>	K_HA_R	CGT AGT CGG GGA CGT CGT AG

3.2 Klonierung, cRNA-Synthese und Insertion des FLAG-Motivs

3.2.1 Bakterienstämme

TOP10 chemically competent cells (Invitrogen)

F⁻ *mcrA* (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) ϕ 80/*lacZ* M15 *lacX74* *deoR* *recA1* *araD139* (*ara-leu*)7697 *galK* *rpsL* (*Str^R*) *endA1* *nupG*

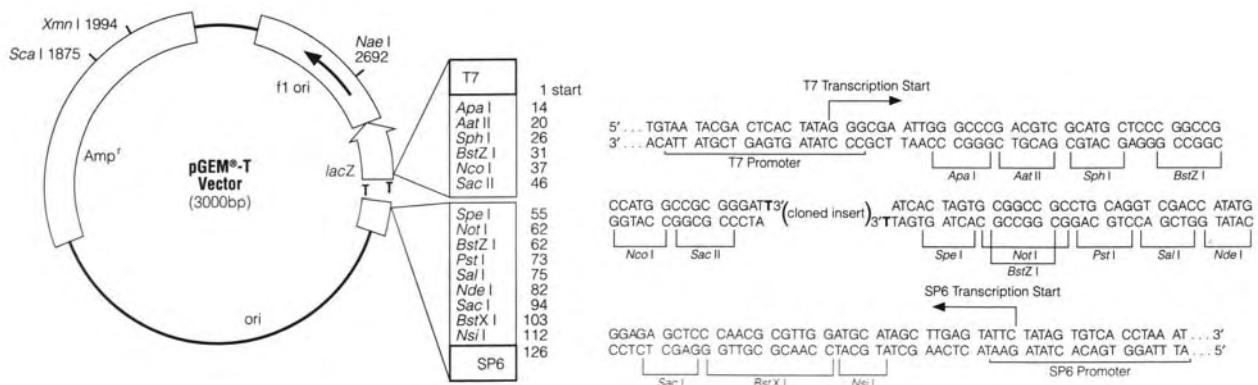
XL1-Blue supercompetent cells (Stratagene)

recA1 *endA1* *gyrA96* *thi-1* *hsdR17* *supE44* *relA1* *lac* [F' *proAB* *lacI^q*Z M15 Tn10 (Tet^r)]

3.2.2 Vektoren

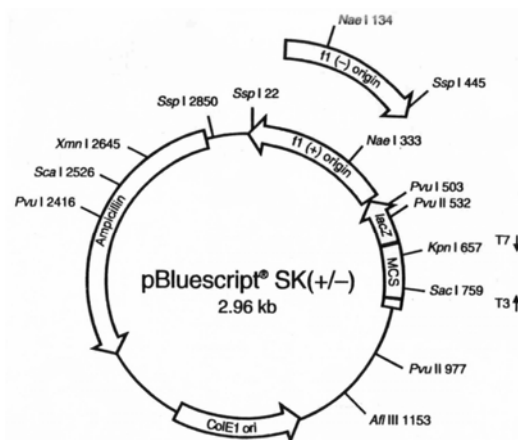
pGEM-T (Promega)

3,0 kb Gesamtlänge, *lac*-Operon, Amp^r, T7-Promotor, SP6-Promotor, MCS (*Apa*I, *Aat*II, *Aph*I, *Nco*I, *Sac*II, *Spe*I, *Not*I, *Pst*I, *Sal*I, *Nde*I, *Sac*I, *Bst*XI, *Nsi*I).



pBluescript SK(+/-) (Stratagene)

2,96 kb Gesamtlänge, LacZ, Amp^r, T3-Promotor, T7-Promotor, f1 origin, MCS (SacI, BstXI, SacII, NotI, EagI, XbaI, SpeI, BamHI, SmaI, PstI, EcoRI, XhoI, ApaI, DraI, KpnI).

**pBlue-PolyA-XbaI (basierend auf pBluescript)**

3,1 kb Gesamtlänge, LacZ, Amp^r, T3-Promotor, f1 origin, PolyA, MCS (SacI, BstXI, SacII, NotI, EagI, XbaI).

β-Galactosidase → T3 promotor +1 →

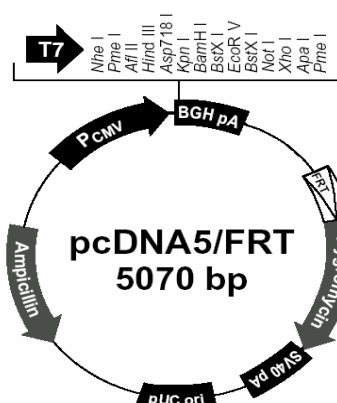
CAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTCGAAATTAACCCCTCACTAAAGGGAACAAAAGCTGGAGCTCCACCGCGTGGCGGCCGCTCTAGA
GTCGATACTGGTACTAATGCGGTTCGAGCTTTAATTGGGAGTGATTTCCTTGTTCGACCTCGAGTGGCGCCACCCCGCGCGAGATCA

XbaI PolyA XhoI ApaI KpnI

TCTAGAGACTGAAGGAGGGTTGAACCTCTGTATTGTCTTTCAAGGGTCATTTTTCCTAAAAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAACTCGAGGGGGGGCCCGTACCC
AGATCTCTGACTTCCTCCCAACTTGAGACATAACAGAAAGTTCACAGTAAAAAGGATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGTAGTCCCGCCCGGCCATGGG

pcDNA5/FRT (Invitrogen)

5,07 kb Gesamtlänge, CMV-Promotor, BGH Poly A, FRT Site, Hyg^r, Amp^r, pUC origin, bla-Promotor, MCS (NheI, PmeI, AflII, HindIII, Asp718I, KpnI, BamHI, BstXI, NotI, XhoI, ApaI, PmeI).



CMV promoter CAAT

721 AAAATCAACG GGACTTTCCA AAATGTCGTA ACAACTCCGC CCCATTGACG CAAATGGGCG
CMV forward priming site TATA 3' end of CMV promoter putative transcriptional start

781 GTAGCGTGT ACGGTGGGAG GTCTATATAA GCAGAGCTCT CTGGCTAACT AGAGAACCCA

841 CTGCTTACTG GCTTATCGAA ATTAATACGA CTCACTATAG GGAGACCCAA GCTGGCTAGC
T7 promoter/priming site NheI

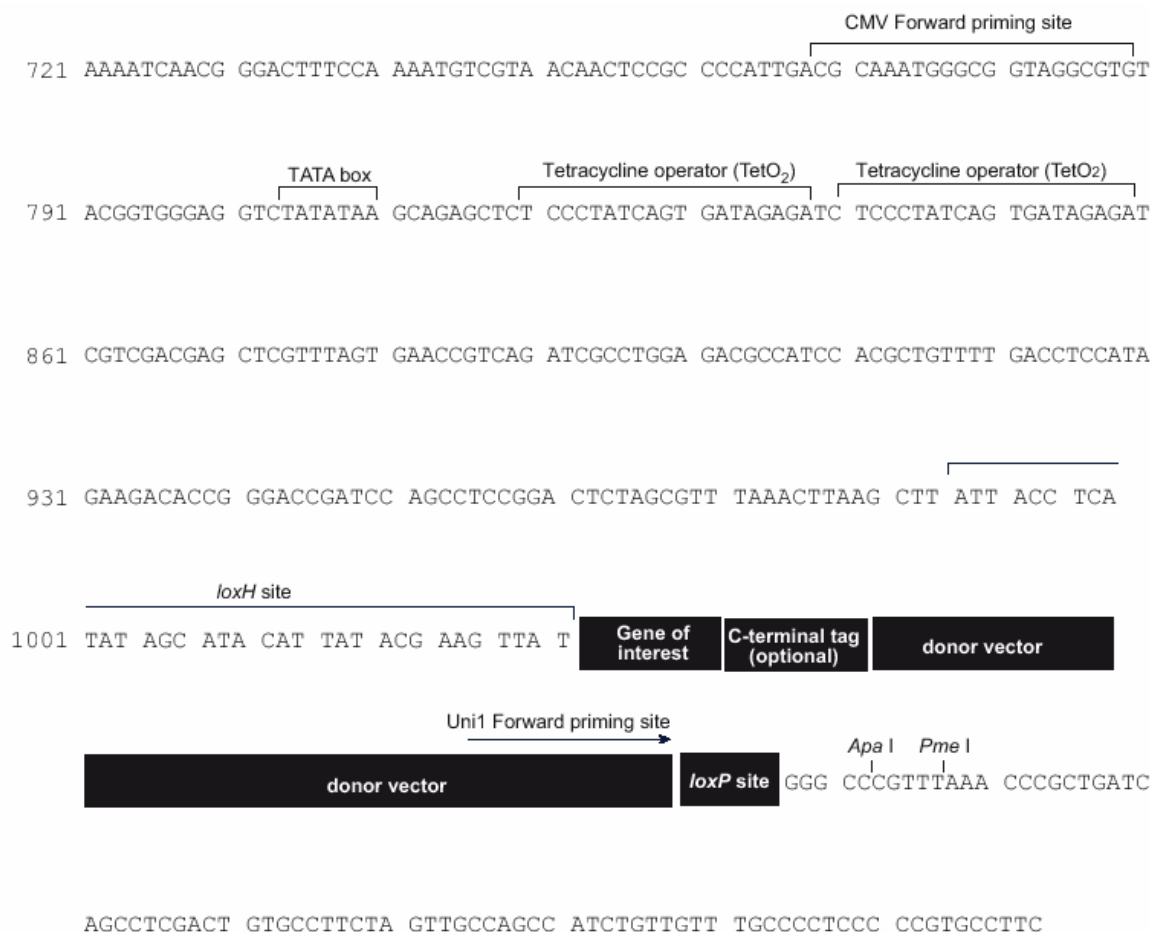
901 GTTTAAACTT AAGCTTGGTA CCGAGCTCGG ATCCACTAGT CCAGTGTGGT GGAATCTGCG
PmeI* AflII HindIII Asp718I KpnI BamHI BstXI*

961 AGATATCCAG CACAGTGGCG GCCGCTCGAG TCTAGAGGGC CCGTTTAAAC CCGCTGATCA
EcoRV BstXI* NotI XhoI ApaI PmeI*

1021 GCCTCGACTG TGCCTTCTAG TTGCCAGCCA TCTGTTGTTT GCCCTCCCC CGTGCCTTCC
BGH reverse priming site

pcDNA4/TO (Invitrogen)

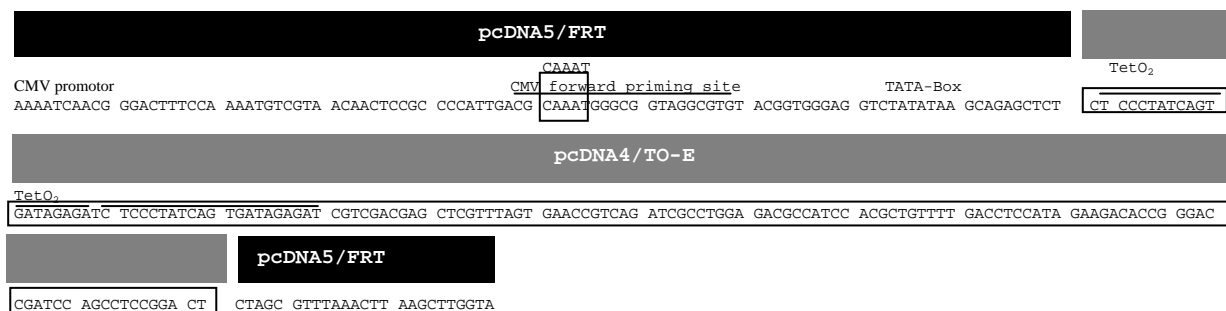
5,0 kb Gesamtlänge, CMV-Promotor, 2x Tetracyclin-Operon (TetO₂), *loxH*, Zeo^r, pUC origin, Amp^r, *loxP*, *Apal*, *PmeI*



pcDNA9 (basierend auf pcDNA5/FRT und pcDNA4/TO)

Hier wurde der Vektor pcDNA5/FRT (in schwarz dargestellt) mit dem Tetracyclin-Operon von pcDNA4/TO (in grau) zusammengefügt.

5,07 kb Gesamtlänge, CMV-Promotor, 2x Tetracyclin-Operon (TetO₂), BGH Poly A, FRT Site, Hyg^r, Amp^r, pUC origin, *bla*-Promotor, MCS (*NheI*, *PmeI*, *AflI*, *HindIII*, *Asp718I*, *KpnI*, *BamHI*, *BstXI*, *NotI*, *XhoI*, *Apal*, *PmeI*).



3.2.3 Kulturmedien

LB-Medium (Luria-Bertani)	Trypton	10 g/l
	NaCl	10 g/l
	Yeast-Extract	5 g/l
	<i>pH 7,0 (NaOH)</i>	
	<i>autoklavieren bei 20 min, 121°C, 1 bar</i>	
	<i>auf 55°C abkühlen und Zugabe von:</i>	
	IPTG	25 mg/ml H ₂ O
	X-Gal	20 mg/ml DMF
	Ampicillin	100 µg/ml
LB-Agar	wie LB-Medium	
	+ Agar-Agar vor dem Autoklavieren	20 g/l
NZY⁺ Broth	NZ amine (casein hydrolysate)	10 g/l
	Yeast- Extract	5 g/l
	NaCl	5 g/l
	<i>pH 7,5 (NaOH)</i>	
	<i>autoklavieren bei 20 min, 121°C, 1°bar</i>	
	<i>auf 55°C abkühlen und Zugabe von:</i>	
	1 M MgCl ₂	12,5 ml
	1 M Mg SO ₄	12,5 ml
	20 % Glucose	20 ml
SOC Medium (Invitrogen)	Trypton	2 %
	Yeast-Extract	0,5 %
	NaCl	10 mM
	KCl	2,5 mM
	MgCl ₂	10 mM
	MgSO ₄	10 mM
	Glucose	20 mM

3.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

6 x Ladepuffer	Bromphenolblau	0,2 %
	Xylen Cyanol FF	0,2 %
	Glycerol	60 %
	EDTA	60 mM
10 x TAE-Puffer	Tris	484 g
	Eisessig	114,2 ml
	0,25 M EDTA, pH 8,0	400 ml
1 x TAE-Puffer	in ddH ₂ O als Laufpuffer	
Agarosegel	1 % Agarose in 1 x TAE-Puffer	

Längenstandards

DNA-Längenstandard XIV (Roche Diagnostics, Mannheim)
100, 200, 300, 400, 500, 1000, 1500, 2642

GeneRuler™ DNA Ladder Mix (MBI Fermentas, St. Leon-Roth)

100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1031, 1200, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 5000, 6000, 8000, 10000

3.2.5 Enzyme

Restriktionsenzyme

Enzym	erkannte Schnittstelle	Puffer	BSA benötigt	Bezugsquelle
SacI	5'...GAGCTC...3' 3'...CTCGAG...5'	NEBuffer 1	Ja	NEB*
SacII	5'...CCGCGG...3' 3'...GGCGCC...5'	NEBuffer 4	Nein	NEB
XbaI	5'...TCTAGA...3' 3'...AGATCT...5'	NEBuffer 2	Ja	NEB
XhoI	5'...CTCGAG...3' 3'...GAGCTC...5'	NEBuffer 2	Ja	NEB
KpnI	5'...GGTACC...3' 3'...CCATGG...5'	NEBuffer 1	Ja	NEB
DpnI	5'...GATC...3' 3'...CTAG...5'	Buffer # 7	Nein	Stratagene**

* New England Biolabs, Frankfurt am Main

** Stratagene, La Jolla, CA, USA

DNA-Polymerasen

Expand™ High Fidelity PCR System
YieldAce™ DNA Polymerase
Thermoprime Plus™ DNA Polymerase
Pfu Turbo® DNA Polymerase

Roche Diagnostics, Mannheim
Stratagene, La Jolla, CA, USA
ABGene, Hamburg
Stratagene, La Jolla CA, USA

Reverse Transkriptase

Advantage™ RT-for-PCR Kit MMLV
(Murine Moloney Leukaemia Virus)

BD Clontech, Heidelberg

Ligasen

T4 DNA Ligase
Rapid DNA Ligation Kit
T4 DNA Ligase

BD Clontech, Heidelberg
Roche Diagnostics, Penzberg
Promega, Madison, WI, USA

Sonstige Enzyme

DNA-Polymerase I Large Fragment
(Klenow Fragment)
T3 RNA-Polymerase
RQ1 RNase-free DNase

NEB, Frankfurt am Main

Promega, Madison, WI, USA
Promega, Madison, WI, USA

3.2.6 Kommerziell erhältliche Kits und Material

High Pure [®] PCR Product Purification Kit	Roche Diagnostics, Penzberg
PeqGOLD RNA Pure [™]	PegLab, Erlangen
Oligotex [™] mRNA Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Advantage [®] RT-for-PCR Kit	BD Clontech, Heidelberg
QIAEX II [®] Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAGEN [®] Plasmid Midi Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAprep [®] Plasmid Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Rapid DNA Ligation Kit [®]	Roche Diagnostics, Penzberg
pGEM [®] -T Vector System I	Promega, Mannheim
Riboprobe [®] in vitro Transcription System T3	Promega, Mannheim
QuikChange [®] Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, La Jolla, CA, USA
Sephadex G-50 [®] Quick Spin Columns	
for RNA purification	Roche Diagnostics, Penzberg
m ⁷ G(5')ppp(5')G (Capping Analog)	Promega, Mannheim

3.2.7 cDNA-Panels und RNA

Human Heart PolyA ⁺ -RNA	
Human Brain PolyA ⁺ -RNA	
Human Small Intestine PolyA ⁺ -RNA	BD Clontech, Heidelberg
Human Multiple Tissue cDNA (MTC [™]) Panel I	
Human Multiple Tissue cDNA (MTC [™]) Panel II	BD Clontech, Heidelberg
Human Major Organs 1	BioCat, Heidelberg
Rat Multiple Tissue cDNA (MTC [™]) Panel I	BD Clontech, Heidelberg

3.3 Expression in *Xenopus laevis*-Oozyten

3.3.1 Versuchstiere

Für die heterologe Expression der Proteine wurden weibliche südafrikanische Krallenfrösche *Xenopus laevis* eingesetzt, deren Oozyten mit den entsprechenden cRNAs injiziert wurden. Die Tiere wurden von der Versuchstierhaltung der Universität Konstanz (Zucht) und Xenopus Express (Haute-Loire, France) bezogen.

3.3.2 Verwendete Lösungen und Puffer für die Oozyten

Modifizierte Barth's Lösung	NaCl	88 mM
	HEPES	15 mM
	NaHCO ₂	2,4 mM
	KCl	1,0 mM
	Ca(NO ₃) x 4 H ₂ O	0,3 mM
	CaCl ₂ x 6 H ₂ O	0,41 mM
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,82 mM
	pH 7,6 (NaOH), vor Gebrauch 0,1 % Gentamicin zugeben	

OR-2 Puffer	NaCl	82,5 mM
	HEPES	5,0 mM
	KCl	2,5 mM
	MgCl ₂ x 6 H ₂ O	1,0 mM
	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	1,0 mM
	pH 7,8 (KOH)	

Natrium-Lösung (Messpuffer)	NaCl	100 mM
	HEPES	10 mM
	KCl	2 mM
	CaCl ₂ x 6 H ₂ O	1 mM
	MgCl ₂ x 6 H ₂ O	1 mM
	pH 7,5 (1 M Tris)	

3.3.3 Radioaktiv markierte Substanzen

Substanz	Spezifische Aktivität	Konzentration	fmol / dpm
[³ H]Chenodeoxycholat	0,1 mCi/ml, 0,051 Ci/mmol	1949,3 µM	8,86062
[³ H]Cholat	0,1 mCi/ml, 0,055 Ci/mmol	1818,2 µM	8,2645
[³ H]DHEAS	1,0 mCi/ml, 74,0 Ci/mmol	13,5 µM	0,0061426
[³ H]Digoxin	1,0 mCi/ml, 37,0 Ci/mmol	27 µM	0,0122851
[³ H]Leukotrien C ₄	0,01 mCi/ml, 115,3 Ci/mmol	0,087 µM	0,0039423
[³ H]Prostaglandin E ₂	0,1 mCi/ml, 151 Ci/mmol	0,7 µM	0,0030102
[³ H]Estron-3-sulfat	1,0 mCi/ml, 57,3 Ci/mmol	17,5 µM	0,0079328
[³ H]Estradiol-17β-glucuronid	1,0 mCi/ml, 40,5 Ci/mmol	24,69 µM	0,011223
[³ H]Ouabain	1,0 mCi/ml, 22,5 Ci/mmol	44,4 µM	0,020202
[³ H]Pregnenolonsulfat	1,0 mCi/ml, 20 Ci/mmol	50 µM	0,022727
[³ H]Taurocholat	1,0 mCi/ml, 3,5 Ci/mmol	285,7 µM	0,12987

Alle radioaktiv markierten Substanzen wurden von PerkinElmer Life Sciences Inc., Boston, MA, USA, bezogen.

3.3.4 Materialien

3-Aminobenzoesäure-Ethylester (MS-222, Tricaine)	Sigma, Taufkirchen
Kollagenase D	Roche Diagnostics, Mannheim
Gentamicin	Sigma, Taufkirchen
Operationsbesteck	diverse
Einmal-Skalpelle	Swann-Morton, Sheffield, England
Vicryl 4.0	Ethicon GmbH, Norderstedt

3.4 Immunfluoreszenz in *Xenopus laevis*-Oozyten

3.4.1 Verwendete Lösungen und Puffer

K-Aspartat-Lösung	K-Aspartat	200 mM (34,24 g/l)
	KCl	20 mM (1,49 g/l)
	MgCl ₂	1 mM (0,20 g/l)

EGTA	10 mM (3,80 g/l)
Hepes	10 mM (2,38 g/l)
<i>pH 7,4 (KOH)</i>	

Dent's Fixans	Methanol	80 %
	DMSO	20 %

Methanol 90 %, 70 %, 50 % und 30 % in PBS

PBS (<u>Phosphate buffered saline</u>)	NaCl	137,00 mM (8,0 g/l)
	KCl	2,68 mM (0,2 g/l)
	KH ₂ PO ₄	1,47 mM (0,2 g/l)
	Na ₂ HPO ₄	7,30 mM (1,3 g/l)
	<i>pH 7,4</i>	

PBSAG (<u>PBS</u> + <u>BSA</u> + <u>Goat serum</u>)	BSA	2 %
	Goat serum <i>In PBS</i>	4 %

3,7 % Formaldehyd/PBS	Formaldehyd 37 %	10 %
	PBS	90 %

Ethanol 30 %, 50 %, 70 % und 100 % in PBS

Infiltrationslösung A (IL A)	Technovit 7100 [®]	50 %
	Ethanol	50 %

Infiltrationslösung B (IL B)	Technovit 7100 [®]	10 %
	Härter I*	1 g/100 ml
	<i>Bei 4°C aufbewahren</i>	

Infiltrationslösung B + Härter II	Härter II*	1 ml
	in 15 ml IL B	

* Härter I und II sind im Kit Technovit 7100, Heraeus Kulzer, Wehrheim vorhanden

3.4.2 Antikörper

Anti-FLAG [®] M2 monoklonaler Maus-Antikörper	Sigma, Schnelldorf
Alexa Fluor [®] 488 Goat anti-mouse IgG (H+L)	MoBiTec, Göttingen

3.5 Agarose/Formaldehyd-Gelelektrophorese und Northern Blot

3.5.1 Verwendete Lösungen und Puffer

DEPC-Wasser 0,1 %	1 ml Diethylpyrocarbonat (DEPC, 1 mg/ml)
	ad 1 l ddH ₂ O
	<i>Übernacht bei RT inkubieren (RNAasen werden abgebaut) und autoklavieren (DEPC wird abgebaut)</i>

5 x MOPS-Puffer (2 l)	3-[N-morpholino]-2-hydroxypropanesulfonic acid (MOPS) <i>pH 7,0</i>	0,2 M (83,72 g)
	Sodium Acetat	0,05 M (8,23 g)
	<i>auf 1,6 l mit DEPC-Wasser auffüllen, lösen und Zugabe von:</i>	
	0,5 M EDTA	20 ml
	<i>pH auf 7,0 mit 10 N NaOH einstellen, mit DEPC-Wasser auf 2 l auffüllen und autoklavieren</i>	

3.5.2 Gelelektrophorese

RNA-Probenpuffer	Deionized Formamid	10 ml
	37 % Formaldehyd	3,5 ml
	5 x MOPS-Puffer	2 ml
	<i>mischen, aliquotieren, bei -20°C bis 6 Monate haltbar</i>	

RNA Ladepuffer 2 x (PeqLab, Erlangen)	Formamid	95 %
	Bromphenolblau	0,025 %
	Xylen Cyanol FF	0,025 %
	Ethidiumbromid	0,025 %
	SDS	0,025 %
	EDTA	0,5 mM

1 x MOPS-Puffer	in DEPC behandeltem Wasser als Laufpuffer	
------------------------	---	--

1 % Agarose/ Formaldehydgel	5 x MOPS-Puffer	56 ml
	Agarose	2,79 g
	DEPC-Wasser	174 ml
	<i>mischen und kochen, auf 55°C abkühlen und Zugabe von Formaldehyd</i>	
		50 ml

RNA Ladder High Range (MBI Fermentas, St. Leon-Roth)
200, 500, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000, 6000

3.5.3 Blotten

20 x SSC (1 l)	NaCl	175,4 g
	Sodium Citrat	88,2 g
	DEPC-Wasser	900 ml
	<i>pH mit 10 N NaOH auf 7,2 einstellen, auf 1 l auffüllen, autoklavieren</i>	

20 x SSPE (1 l)	NaCl	175,3 g
	NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	27,6 g
	EDTA	7,4 g
	<i>in 800 ml DEPC-Wasser lösen, pH mit 10 N NaOH auf 7,4 einstellen und Volumen auf 1 l auffüllen. Autoklavieren</i>	

50 x Denhardt's Reagent (500 ml)

Ficoll® (Type 400)	5 g
Polyvinylpyrrolidone	5 g
BSA (Fraktion V)	5 g
<i>in 500 ml DEPC-Wasser lösen, steril filtrieren (0,45 µm) und bei -20°C aufbewahren</i>	

**Pre-Hybridisierung/
Hybridisierungslösung**

Deionized Formamid	50 %
SSPE	5 x
Denhardt's Reagent	2 x
SDS	0,1 %

Stringency Wash Solution I (SWS I)

SSC	2 x
SDS	0,1 %

Stringency Wash Solution II (SWS II)

SSC	0,1 x
SDS	0,1 %

Stripplösung

Deionized Formamid	50 %
SSC	0,1 x
SDS	0,1 %
<i>bei 68°C für 1-2 h oder</i>	
SDS	0,5 %
<i>in DEPC Wasser bei 90-100°C für 10 min und dann für weitere 10 min abkühlen lassen</i>	

Sonstige Materialien

Gel-Blotting-Papier Schleicher und Schuell	MAGV, Rabenau-Londorf
Hybond-N Nylon Membran	Amersham Biosciences, Freiburg
Nick Translation Kit®	Amersham Biosciences, Freiburg
Kodak Bio Max MR Film	Sigma, Deisenhofen

3.6 Zellkultur**3.6.1 Eukaryontische Zelllinie****HEK293-Zellen** (Invitrogen, Karlsruhe)

(Human embryonic kidney cells 293), mit Adenovirus Typ 5 transformiert.

3.6.2 Zellkulturbedarf

24 well Platten	Sarstedt, Nümbrecht
75 cm ² Kulturflaschen	Sigma, Deisenhofen

3.6.3 Zellkulturmedien und Zusätze

D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Invitrogen, Karlsruhe
FKS (Fetales Kälberserum)	Sigma, Deisenhofen
F-12 Nutrient Mixture (HAM) + Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe
L-Glutamine (200 mM)	Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe
Trypanblau	Fluka, Buchs, Schweiz
Trypsin	Gibco, Karlsruhe
Poly-D-Lysin	Sigma, Deisenhofen

Medium für HEK293-Zellen (100 ml)	D-MEM	44 ml
	HAM 12	44 ml
	Glutamin (4 mM)	2 ml
	FKS (10 %)	10 ml

3.6.4 Transiente Transfektion in HEK293-Zellen

Lipofectamin	Invitrogen, Karlsruhe
Tetrazyklin	Sigma, Deisenhofen

3.7 Immunfluoreszenz

3.7.1 Primäre und sekundäre Antikörper

Antikörper	Verwendungszweck	Hersteller
anti-FLAG M2	Monoklonaler Antikörper aus Maus gegen das FLAG-Epitop DYKDDDDK	Sigma, Deisenhofen
anti-FLAG	Polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen das FLAG-Epitop DYKDDDDK	Sigma, Deisenhofen
anti-HA M2	Monoklonaler Antikörper aus Maus gegen das Hämagglutinin-Epitop YPYDVPDYA des Influenza Virus	Roche, Mannheim
anti-Calnexin	Polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen den C-Terminus von Calnexin	Sigma, Deisenhofen
anti-Pan-Cadherin	Monoklonaler Antikörper aus Maus gegen den C-Terminus von Pan-Cadherin	Sigma, Deisenhofen
anti-Actin	Polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen Actin	Sigma, Deisenhofen
WGA (<i>Weat Germ Agglutinin</i>)	Alexa Fluor 594 konjugiertes Lektin. Bindet selektiv an N-Acetylglucosamin- und N-Acetylneuraminsäurereste	Molecular Probes, Karlsruhe
Alexa Fluor 488	Polyklonaler Antikörper aus Ziege gegen Maus IgG (H+L)	MoBiTec, Goettingen
Cy3 anti IgG	Polyklonaler Antikörper aus Ziege gegen Kaninchen IgG (H+L)	Dianova, Hamburg
DAPI (4',6'-Diamidine-2'-Phenylindol Dihydrochlorid)	Fluoreszenzfarbstoff zur Färbung von Zellkernen	Roche, Mannheim

3.7.2 Reagenzien

BSA	Sigma, Deisenhofen
Glycin	Serva, Heidelberg
Normales Ziegenserum	Dako Cytomation, Hamburg
Mowiol	Calbiochem, Darmstadt
Triton X-100	Sigma, Deisenhofen

3.7.3 Verwendete Lösungen und Puffer

Paraformaldehyd (PFA) 4 % (50 ml)

PFA	2 g
H ₂ O (50-60°C)	45 ml
10 x PBS (50-60°C)	5 ml
<i>unter rühren bei 50°C lösen und mit NaOH pH auf 6,8-7,2 einstellen</i>	

Puffer A (1 x PBS + 20 mM Glycine) (110 ml)

1 x PBS	110 ml
Glycin	165,22 mg

Puffer A + 0,2 % Triton X-100 (20 ml)

Puffer A	20 ml
Triton X-100	40 µl

Puffer B (Puffer A + 1 % BSA) (70 ml)

Puffer A	70 ml
BSA	700 mg

Blockierungslösung (Puffer B + 4 % Ziegenserum)

Puffer B	70 ml
Ziegenserum	2,8 ml

DAPI/Methanol 1 : 5000

DAPI in H ₂ O gelöst auf 1 mg/ml	50 µl
Methanol	250 ml

Mowiol

Mowiol	2,4 g
Glycerol	6,0 g
<i>Mischen unter Rühren und Zugabe von:</i>	
H ₂ O	6 ml
<i>Bei RT mehrere Stunden rühren und Zugabe von:</i>	
0,2 M Tris (pH 8,5)	12 ml
<i>über Nacht rühren lassen, 2 h ruhen lassen und für 10 min auf 50°C aufwärmen, anschließend 15 min zentrifugieren, Überstand dekantieren und in Aliquots bei -20°C einfrieren. Vor Verwendung Zugabe von:</i>	
DABCO (Diazobicyclooctan)	0,1 %

3.8 Reagenzien

β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Agar-Agar	Roth, Karlsruhe
Agarose	Roth, Karlsruhe
Aminobenzoessäure-ethylester (MS-222)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Calciumnitrat-Tetrahydrat, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid Dihydrat, $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	Roth, Karlsruhe
Casein enzymatic hydrolysate, N-Z-amine A	Sigma, Steinheim
Chloroform	Roth, Karlsruhe
DHEAS	Sigma, Steinheim
Digoxin	Roth, Karlsruhe
Sodium-Dodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Estron-3-sulfat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Estradiol-17β-glucuronid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethanol (> 99,8 %), EtOH abs.	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Formaldehyd	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Formamid (deionisiert)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glucose	Merck, Darmstadt
Glycerin	Merck, Darmstadt
IPTG (Isopropylthiogalactosid)	BioTech, St. Leon-Roth
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid, KCl	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat-Heptahydrat, $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid-Hexahydrat, $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	Merck, Darmstadt
Mineralöl für Molekularbiologie	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
N,N-Dimethyl-Formamide (DMF)	Sigma, Steinheim
Natriumacetat Trihydrat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid, NaCl	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat, NaHCO_3	Roth, Karlsruhe
Ouabain	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
SOC Medium	GibcoBrl, Paisley, Schottland
Stickstoff, flüssig, N_2	Messer, Griesheim
Szinzillator (Rotiszint 22 eco)	Roth, Karlsruhe
Taurocholat	Sigma, Steinheim
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	Bio-Rad, München
Trinatriumcitrat Dihydrat	Roth, Karlsruhe
Tryptone Peptone	Difco, Detroit, USA
5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Galaktosid (X-Gal)	BioTech, St. Leon-Rot
Yeast Extract	Difco, Detroit, USA

3.9 Geräte

Accupette (1-100 ml)	NeoLab, Heidelberg
Analysewaagen:	
- AE 260 Delta Range	Mettler-Toledo, Gießen
- Precisa 3000C-6000D	DAK-Oerlikon, Zürich, Schweiz
Autoklav Sanoclav	Wolf, Geislingen
Brutschrank	Heraeus, Hanau
Elektrophorese-Kammern	Werkstatt MZI, Gießen
- 14,5 x 6,5 cm	

- 35,5 x 11,0 cm	
Fluoreszenzmikroskop DM6000B	
S/W Kamera DFC350FX	Leica Mikrosysteme, Bensheim
Flüssigkeitsszintillationszähler Wallac 1409	Pharmacia, Freiburg
G24 Environmental Incubator shaker	New Brunswick Scientific, Edison, USA
Gelschlitten	Werkstatt MZI, Gießen
- 7,5 x 5 cm	
- 12 x 18 cm	
Image Master VDS	
Video-Printer-Papier	Amersham Pharmacia Biotech,
Mikroinjektor Nanoliter 2000	Buckinghamshire, UK
Perkin-Elmer GeneAmp Cyclor Typ 2400	MS Laborgeräte, Wiesloch
Photometer DU-64	World Precision Inst., Sarasota, USA
Quarzdestille Typ Bi 18 Nr. H2	Perkin-Elmer, Weiterstadt
Quarkküvette, Schichtdicke 10 mm	Beckmann, München
Spannungsquelle (max. 200 mA, 1 kV, 150 W)	Heraeus-Schott, Hanau
SpeedVac SPD111V	Hellma, Mülheim/Baden
Spannungsgeber (0-200 mA, 1 kV, 150 W)	Werkstatt des MZI, Gießen
Sterilwerkbank, Clean Air, Typ DLF-REL 6	Savant, Holbrook, NY, USA
UV-Transilluminator	Werkstatt MZI, Gießen
Vortex VF 2	Heraeus, Hanau
Waage (0,01-500 g)	Bachofer, Reutlingen
Wasserbad	Janke und Kunkel, Staufen
Zentrifugen:	Mettler-Toledo, Gießen
- Megafuge 1.0	Memmert, Schwalbach
- Sorvall Kühlzentrifuge RC5C	
Rotor HB4	
- Tischzentrifuge 5415D	Heraeus, Hanau
- Vakuumzentrifuge Speed Vac SC 110	Sorvall/Du Pont, Bad Homburg
	Eppendorf, Hamburg
	Savant, Farmingdale, USA

3.10 Bioinformatik

BLAST, NCBI www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/	Sequenzvergleich gegen Datenbank
Boxshade 3.21 www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html	Grafische Darstellung von Alignments
Chromas 2.23 technelysium.com.au	Auswertung von Sequenzspuren
EMBL-EBI, European Bioinformatics Institute www.ebi.ac.uk/Information/sitemap.html	Datenbankportal Europa
Ensembl, EBI www.ensembl.org/	Gen Browser
HMMTOP 2.0 enzim.hu/hmmtop/	Vorhersage von Transmembrandomänen
HUGO Gene Nomenclature Committee www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/	Nomenklatur humaner Gene

NCBI <i>www.ncbi.nlm.nih.gov/</i>	Datenbankportal USA
Oligo 4.0, Wojciech Rychlik, Oslo, Norwegen	Primerauswahl
PSORT II Prediction <i>psort.ims.u-tokyo.ac.jp/form2.html</i>	Suche nach Proteinsorting-Signalen
TC (Transporter Classification System) <i>www-biology.ucsd.edu/~msaier/transport/</i>	Transporterklassifikation
TMAP	Vorhersage von TMDs <i>mbb.ki.se/tmap/</i>
TMHMM Server v. 2.0 <i>cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/</i>	Vorhersage von TMDs
TMPred <i>ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html</i>	Vorhersage von TMDs
TopPred 2 <i>sbc.su.se/~erikw/toppred2/</i>	Vorhersage von TMDs
TreeView 1.6.6 <i>taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview</i>	Darstellung von Verwandschaftsdiagrammen

4. Methoden

Soweit nicht anders angegeben wurden die hier beschriebenen Methoden nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

4.1 Allgemeine molekularbiologische Methoden

Aufreinigung von PCR-Amplifikaten

Für die Aufreinigung von PCR-Ansätzen wurde das filterbasierte Kit High Pure PCR Product Purification (Roche) verwendet. Das resultierende Eluat ist sowohl für die Klonierung als auch für die Sequenzierung geeignet.

DNA- und RNA- Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung gewonnener DNA und RNA erfolgte in einem UV-Photometer (Beckmann), in dem bei einer Wellenlänge von 260 nm die optische Dichte (OD_{260}) der Nukleinsäure gemessen wird. Der Quotient OD_{260}/OD_{280} sollte für DNA zwischen 1,7 und 2,0 und für RNA über 1,8 liegen. Die Konzentration der Proben kann nach folgender Formel berechnet werden:

$$[\text{in } \mu\text{g}/\mu\text{l}] = \frac{OD_{260} \times E \text{ } \mu\text{g} \times 200 \text{ } \mu\text{l}}{5 \text{ } \mu\text{l} \times 1000 \text{ } \mu\text{l}}$$

E (Extinktionskoeffizient in Wasser)= 40 μg für RNA und 50 μg für DNA

Agarose-Gelelektrophorese

Es wurden 1 %, 1,5 % und 2 %ige Agarose-Gele verwendet. Jede 10 μl DNA wurden mit 1 μl 6 x Loading Dye Solution gemischt und auf die Gele aufgetragen. Als Marker wurden DNA-Längenstandard XIV (Roche) oder Gene Ruler DNA Ladder Mix (MBI, Fermentas) eingesetzt. Die Auftrennung der Banden wurde dann bei 70 mA (kleine Gele) bis 140 mA (große Gele) für 45 bis 90 min durchgeführt. Als Laufpuffer wurde 1 x TAE verwendet. Anschließend wurden die Gele 15 min in Ethidiumbromidlösung gefärbt, mit Wasser aufgespült und auf dem UV-Transilluminator fotografiert.

Restriktionsenzymatische Spaltung von DNA

Es wurden zwischen 5-10 U Enzym eingesetzt, um 1 μg Plasmid zu verdauen. Hier wurden die mitgelieferten Puffer benutzt und die Reaktion erfolgte bei 37°C. Plasmid-DNA wurde für 1 h inkubiert. Für die cRNA-Synthese wurden die Plasmide über Nacht inkubiert.

Plasmid-Präparationen im Mini- und Midi-Maßstab

Für die Präparation von Plasmiden im Mini-Maßstab wurde das *QIAprep Miniprep Kit* (Qiagen) benutzt. Die Präparation in großen Mengen (Midi) erfolgte mit Hilfe des *Qiagen Plasmid Midi Kits*. Nach der Übernachtskultur der rekombinanten *E. coli* im Inkubator wurden 2 ml (Mini-Maßstab) bzw. 50 ml (Midi-Maßstab) in entsprechende Gefäße überführt und zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 500 µl (Mini) bzw. 5 ml (Midi) Wasser resuspendiert und erneut zentrifugiert. Mit den resultierenden Pellets wurden dann nach Angaben des Herstellers die Plasmid-Präparationen durchgeführt.

4.2 Total-RNA Isolierung aus tierischem Gewebe

Es wurden aus unserem Tierstall stammende Wistar-Ratten, Mäuse (Stamm C57BL/6J) sowie *Xenopus laevis* Frösche verwendet. Nach Tötung der Tiere durch Genickbruch wurden Organe entnommen, zerkleinert, in 2 ml vorgewogene Reaktionsgefäße überführt und schnell in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Reaktionsgefäße mit den Geweben wurden nachgewogen, um die Gewebemenge zu bestimmen und bei -80°C bis zur späteren Analyse gelagert. Für die Isolierung von Total-RNA ist die peqGOLD RNAPure-Methode (peqLab) benutzt worden. Da das peqGOLD-Reagenz in einer einphasigen Lösung Guanidinisothiocyanat und Phenol beinhaltet, wurde eine erhebliche Vereinfachung und Verkürzung der Präparationen erreicht. Mit dieser Methode wurden gute Ausbeuten für bekanntermaßen schwierige Gewebe (u.a. Herz, Gehirn, Pankreas) erzielt. Am Tag der RNA-Isolierung wurden die Gewebe aus dem Tiefkühlschrank (-80°C) genommen und in flüssigen Stickstoff gestellt. Das Gewebe wurde in peqGOLD (Verhältnis: 1 ml peqGOLD pro 50-100 mg Gewebe) gelegt und mit Hilfe eines elektrischen Rotor-Stator-Homogenisators homogenisiert. Das Salz Guanidinisothiocyanat wirkt als chaotropes Agens, das Zellen lysieren und zugleich RNasen vollständig inaktivieren kann. Das Probenvolumen sollte nicht mehr als 10 % des verwendeten peqGOLD-Volumens betragen. Das Homogenat wurde danach in Form von 1 ml Aliquots in neue 2 ml Reaktionsgefäße überführt. Die Proben wurden dann für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 200 µl Chloroform je eingesetztem ml peqGOLD zugegeben und für 15 s kräftig geschüttelt. Anschließend wurden die Proben für weitere 3 bis 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden die Proben für 5 min bei $12.000 \times g$ und 4°C zentrifugiert. Die Zugabe von Chloroform und der Zentrifugationsschritt führen zu einer Phasentrennung, wobei die RNA in der oberen wässrigen Phase enthalten ist. Die DNA und Proteine verbleiben dagegen in der unteren organischen Phase bzw. in der Interphase. Die obere Phase wurde abgezogen und in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Es wurden 500 µl Isopropanol pro eingesetztem ml peqGOLD zugegeben. Die Proben wurden für 5 bis 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden sie für 10 min bei $12.000 \times g$ und 4°C zentrifugiert. Das Präzipitat sollte von gelartiger Konsistenz sein und an der unteren Seite des

Röhrchens liegen. Der Überstand wurde vorsichtig abgezogen und das Pellet zweimal mit 1 ml 75 %igem Ethanol durch Zentrifugation (10 min) gefällt und gewaschen. Die Pellets wurden an der Luft getrocknet. Zum Schluss wurden die Pellets in RNase-freiem Wasser gelöst und auf Eis für 30 min resuspendiert. Einzelne Aliquots wurden pro Gewebe zusammengefasst und die Konzentration der RNA im Beckmann Photometer bei 260 nm bestimmt. 2 µl der zu messenden Proben wurden in 198 µl ddH₂O verdünnt. Als Leerwert dienten 198 µl ddH₂O plus 2 µl RNase freies Wasser. Die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm (OD₂₆₀) sollte zwischen 0,1 und 1,0 liegen und der Quotient OD₂₆₀/OD₂₈₀ sollte größer als 1,8 sein. Die RNA-Proben wurden aliquotiert (z.B. 3 x 10 µl, 2 x 50 µl und Rest) und bei -80°C gelagert.

4.3 RNA-Gele zur Qualitätskontrolle

Zur Qualitätskontrolle der gewonnenen RNAs wurde eine Elektrophorese in einem 1 %igen Agarose/Formaldehyd-Gel (denaturierendes Gel) vorgenommen. Da die RNA gegenüber überall bestehender RNasen sehr empfindlich ist, mussten zuerst Arbeitsfläche, Kammer und Agarose-Schlitten mit 70 % Ethanol und anschließend mit DEPC-Wasser gut abgewischt werden. Danach wurden 0,5 g Agarose in 43 ml TAE-Puffer durch Kochen gelöst. Dann wurde die Lösung auf 50°C abgekühlt und anschließend wurden 7 ml 37 %iges Formaldehyd zugegeben und in den Agarose-Schlitten gegossen. Auspolymerisierte Gele wurden in die Kammer gestellt und für etwa 10 min bei 20 mA eingelaufen. Zwischendurch wurden 5 µg Total-RNA mit 2-fach konzentriertem Probenpuffer vermischt und bei 65°C für 10 min denaturiert. Nach der Denaturierung wurden die Proben auf Eis gestellt, mit 2 µl RNA Loading Dye gemischt und auf dem Gel aufgetragen. Die Elektrophorese lief bei 50-60 mA und 100 V für 90 min. Anschließend wurde das Gel mit Ethidiumbromid gefärbt und unter dem UV-Licht begutachtet.

4.4 Gewinnung von polyA⁺-RNA aus Total-RNA

Die proteincodierende mRNA entspricht nur 1 bis 5 % der gesamten RNA einer Zelle. Die mRNA besitzt einen 3'-polyA-Schwanz von 20-250 Adenosin-Nukleotiden (polyA⁺-RNA), über welchen sie aus einer Total-RNA Präparation nach dem Oligotex-Prinzip (Qiagen) aufgereinigt werden kann. Die durch diese Methode erhaltenen mRNA-Präparationen wurden für die Klonierung von Ratte-, Maus- und *Xenopus laevis*-P7 verwendet. Größere Mengen von polyA⁺-RNA (im Midi-Maßstab) mussten für die Northern Blot-Analyse von Ratte-P7 gewonnen werden.

Zuerst wurde die Oligotex-Suspension im Wasserbad bei 37°C aufgewärmt, dann gevortext und bei RT belassen. Das Wasserbad wurde auf 70°C umgestellt und der Puffer OEB darin aufgewärmt. 250 µg bis 1 mg Total-RNA wurden mit DEPC-Wasser auf ein Endvolumen von 500 µl aufgefüllt. Anschließend wurden 500 µl Puffer OBB und 30 bis 55 µl Oligotex-Suspension in jede Probe zugegeben. Die Proben wurden beim Pipettieren gut gemischt. Danach wurden die

Proben bei 70°C im Wasserbad für 3 min inkubiert und dann bei RT für 10 min inkubiert. Dieser Schritt ermöglicht die Hybridisierung von polyA⁺RNA mit den Oligo-dT Oligotex-Kügelchen. Nach der Inkubationszeit wurden die Proben bei maximaler Geschwindigkeit für 2 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgezogen. Die resultierenden Pellets wurden in 400 µl Puffer OW2 durch Vortexen resuspendiert. Währenddessen wurde eine Säule in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gestellt. Dann wurden die Proben in die Säulen überführt und bei maximaler Geschwindigkeit für 1 min zentrifugiert. Die an den Oligotex-Kügelchen gebundene mRNA bleibt in der Säule hängen wobei der Durchfluss verworfen wird. Die Säulen wurden in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß gestellt und mit 400 µl Puffer OW2 gewaschen. Danach wurden die Proben bei maximaler Geschwindigkeit 1 min zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Zuletzt wurden die Säulen in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß gesetzt und mit 20-100 µl 70°C warmem OEB-Puffer resuspendiert. Die Proben wurden durch Pipettieren gemischt und 1 min zentrifugiert. Das resultierende Eluat enthält die polyA⁺-RNA. Anschließend wurde die Konzentration der Proben im Beckmann Photometer bestimmt.

4.5 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese erfolgte mit Hilfe des *Advantage RT-for-PCR* Kits (Clontech). Als Ausgangsprobe für die cDNA-Synthese dienten sowohl Total-RNA- als auch polyA⁺-RNA-Präparationen. Für die Klonierung wurde ausschließlich polyA⁺-RNA verwendet. Für Expressionsprofile war eine cDNA-Synthese aus Total-RNA ausreichend. Hier werden die mRNAs mit Hilfe einer Reversen Transkriptase (RT, MMLV: Moloney-Murine Leukemia Virus) in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Als Primer dienten Oligo (dT)₁₈ Primer.

In einem 0,5 ml Reaktionsgefäß wurden 0,2-1 µg Total-RNA oder polyA⁺-RNA mit DEPC-Wasser auf ein Volumen von 12,5 µl aufgefüllt. Anschließend wurden die Oligo(dT)₁₈ Primer (1,0 µl) zugegeben. Diese Mischung wurde bei 70°C für 2 min erhitzt und danach folgende Reagenzien zugegeben:

5 x Reaktion Puffer	4,0 µl
dNTP-Mix (10 mM)	1,0 µl
Recombinant RNase Inhibitor	0,5 µl
MMLV Reverse Transcriptase	1,0 µl

Anschließend wurden die Proben bei 42°C für 60 min inkubiert und die Reaktion nach einer Inkubation von 5 min bei 94°C gestoppt. Die Proben wurden mit DEPC-Wasser auf 100 µl verdünnt, in 10 µl Aliquots verteilt und bei -70°C gelagert.

4.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

PCR-Methoden wurden in dieser Arbeit zum Nachweis spezifischer DNA-Abschnitte (Expressionsprofile, Klonierungskontrolle), zur Klonierung von Nukleinsäuren und zum Einfügen des Flag-Motivs bzw. HA-Motivs verwendet.

4.6.1 Klonierungs-PCR

Primer. Die Klonierung von Maus- und Ratte-P7 erfolgte über Schnittstellen-enthaltende Primer (Klonierungsprimer). Bei der Erstellung solcher Klonierungsprimer sind einige Basen-Austausche erlaubt, sodass sie die entsprechenden Restriktionsschnittstellen aufweisen. Es wurde auch auf die sog. Klammer an den 5'-Enden einer Schnittstelle geachtet (2 Basen bei *Xba*I und 4 Basen bei *Sac*I und *Sac*II). Die Annealing-Temperatur wurde aus der Schmelztemperatur (T_m) der Primer abgeleitet. T_m wurde wie folgt berechnet:

$$T_m = 81,5 + 0,41(\% \text{ GC}) - 675/\text{Primerlänge} - \% \text{ Fehlpaarungen}$$

Für P7 von Mensch und Frosch wurde eine T/A-Klonierungsstrategie eingesetzt. Das Prinzip liegt darin, dass einige Polymerasen (z.B. *Taq Polymerase*) die Eigenschaft besitzen, nach der Amplifikation am 3'-Ende einen Deoxyadenosinüberhang zu bilden. Dieser A-Überhang ermöglicht die Ligation des PCR-Amplifikats mit einem T/A-Klonierungsvektor (z.B. pGEM-T), welcher durch einen 3'T-Überhang gekennzeichnet ist. T_m -Werte für T/A-Klonierungsprimer wurden nach folgender Formel berechnet:

$$T_m = 2(A+T)+4(G+C)$$

Die Primersequenzen wurden stets so gewählt, dass sie Start- und Stop-Codon umspannten und so der komplette Leserahmen der Modellsequenzen kloniert werden konnte.

PCR-Ansatz. Für Klonierungsexperimente (über Schnittstellen oder T/A-Klonierung) wurde das *Expand High Fidelity PCR System* (Roche) eingesetzt. Dieses System besteht aus dem Gemisch einer thermostabilen *Taq*-DNA-Polymerase und einer *Tgo*-DNA-Polymerase mit hoher 3'-5'-Exonuklease-Aktivität (hohe Lesegenauigkeit).

Folgende Reagenzien wurden zusammengemischt:

DNA-Template	5-10 µl cDNA (50 ng für Plasmid-DNA)
Primer_F (10 pmol/µl)	2 µl
Primer_R (10 pmol/µl)	2 µl
dNTP-Mix (10 mM)	1 µl

Polymerase-Puffer	
mit 15 mM MgCl ₂	10 µl
<i>High Fidelity</i> Enzym-Mix	0,75 µl (~2,6 U)
ddH ₂ O ad	100 µl Endvolumen

Die Proben wurden gut gemischt, kurz abzentrifugiert und in einem *Perkin-Elmer Thermocycler* 2400 inkubiert. Für die RT-PCR zum Expressionsnachweis wurden 0,5 µl einer *Taq*-Polymerase (*Thermoprime Plus*, ABGene) verwendet. Der PCR-Ansatz wurde mit Wasser auf 50 µl aufgefüllt. Alle anderen Komponenten wurden entsprechend obigem Schema eingesetzt.

Verlauf der PCR. Es wurde die Methode der sogenannten *Touchdown*-PCR angewendet. Der typische Verlauf war:

Touchdown-PCR:

1. Denaturierung	94°C	2 min
2. Denaturierung	94°C	15 min
3. Annealing	T _m -2°C	30 sec
	(-0,5°C/Zyklus)	
4. Elongation	72°C	1 min/1000 bp

Diese Schritte wurden zuerst 10-mal wiederholt. In einem zweiten Zyklusbereich wurde die PCR mit einer konstanten Anlagerungstemperatur (T_m - 7°C) für weitere 20-30 Zyklen fortgesetzt.

4.6.2 Mutagenese-PCR mit *DpnI*-Restriktion

Zur Einführung von Mutationen in doppelsträngige DNA wurde das *QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene) verwendet. Die Mutationen werden mit Hilfe von zwei komplementären Primern in die Ausgangsplasmide, welche die entsprechenden cDNA-Klone enthielten, durch Mutagenese-PCR eingeführt. Diese Methode wurde für die Insertion des FLAG-Motivs bzw. des HA-Motivs in die cDNA-Sequenzen des P7 von Mensch, Ratte, Maus und Frosch eingesetzt.

Primer. Die Primer wurden nach folgenden Angaben entworfen:

1. Die Primer sollten die gewünschte Mutation in der Mitte ihrer Sequenz und 10 bis 15 spezifische Basen an beiden Seiten der Mutation enthalten.
2. Beide Primer sollten komplementär sein und die gewünschte Mutation sollte in beiden Primern vorhanden sein.

3. Die Länge der Primer sollte zwischen 25 und 45 Basenpaare betragen und ihre Schmelztemperatur (T_m) sollte über 78°C liegen. Die T_m wurde nach folgender Formel berechnet:

$$T_m = 81,5 + 0,41(\%GC) - 675/N - \% \text{ Fehlpaarungen}$$

N = Länge der Primer

4. Der GC-Gehalt sollte mindestens 40 % betragen und die Primer sollten an ihren 3'-Enden in einem einzelnen G oder C enden.

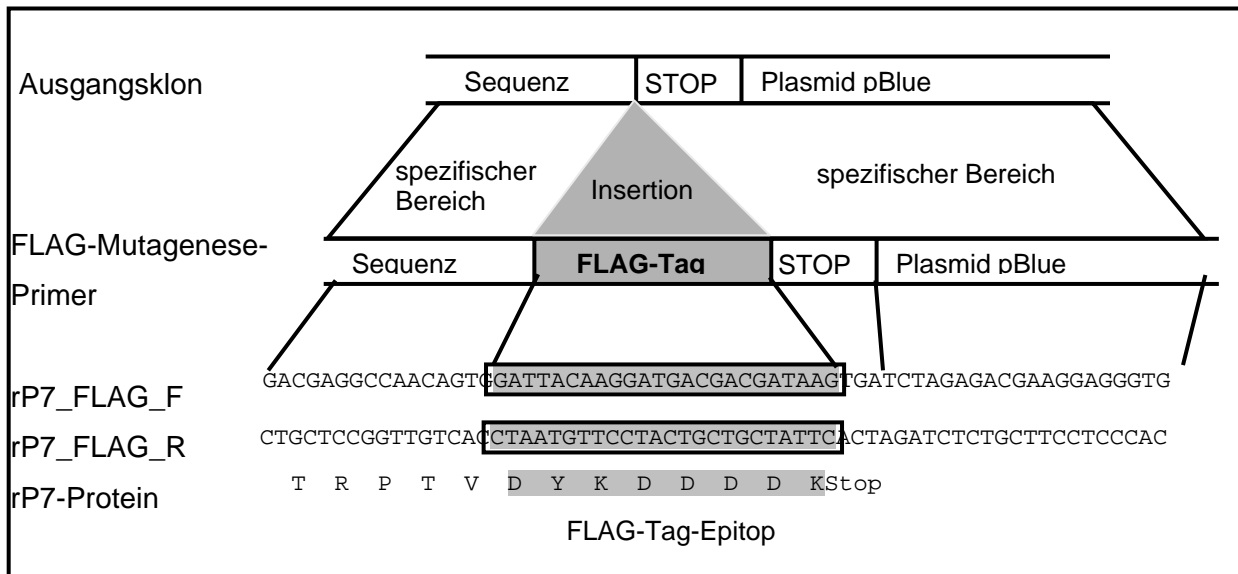


Abb. 5. Primer-Design zur Insertion des FLAG-Motivs durch Mutagenese-PCR. Grau hinterlegt ist die Stelle, in welcher die Mutation eingefügt wird. In den flankierenden Bereichen des FLAG-Motivs liegen spezifische Bereiche, welche die Sequenz des Ausgangsklons tragen. Als Beispiel dienen Primer für Ratte-P7. Die Primer sind zueinander komplementär. Eine Übersetzung in die entsprechende Aminosäuresequenz mit dem späteren FLAG-Tag-Epitop ist für das mutierte P7-Protein der Ratte gezeigt.

PCR-Ansatz. Bei der *QuickChange site-directed*-Mutagenese wird eine *high fidelity PfuTurbo* DNA-Polymerase verwendet. Diese Polymerase amplifiziert mit sehr wenigen aleatorischen Mutationen beide Stränge des Ausgangsplasmids. Das Ergebnis sind mutierte ungeschlossene Plasmide (sogenannte *nicked circles*), die die gewünschte Mutation enthalten.

Mutagenese-PCR-Ansatz

Ausgangsplasmid (dsDNA)	10 µl (50 ng)
Mutagenese-Primer_F	10 µl (125 ng)
Mutagenese-Primer_R	10 µl (125 ng)
dNTP-Mix	1 µl
10 x Reaction Puffer	5 µl
<i>Pfu Turbo</i> DNA-Polymerase	1 µl (2,5 U)
Wasser ad	50 µl Endvolumen

Verlauf der Mutagenese-PCR. Die oben aufgelisteten PCR-Komponenten wurden gut gemischt und kurz abzentrifugiert. Die PCR-Ansätze wurden in den *Thermocycler* gestellt und die DNA zuerst bei 95°C für 30 s denaturiert. Danach folgten 18 PCR-Zyklen. Der Verlauf der Mutagenese-PCR hatte das folgende Profil:

Mutagenese-PCR

1 Zyklus	Denaturierung	95°C	30 sec
18 Zyklen	Denaturierung	95°C	30 sec
	Annealing	55°C	1 min
	Elongation	68°C	1 min/1000 bp Plasmid

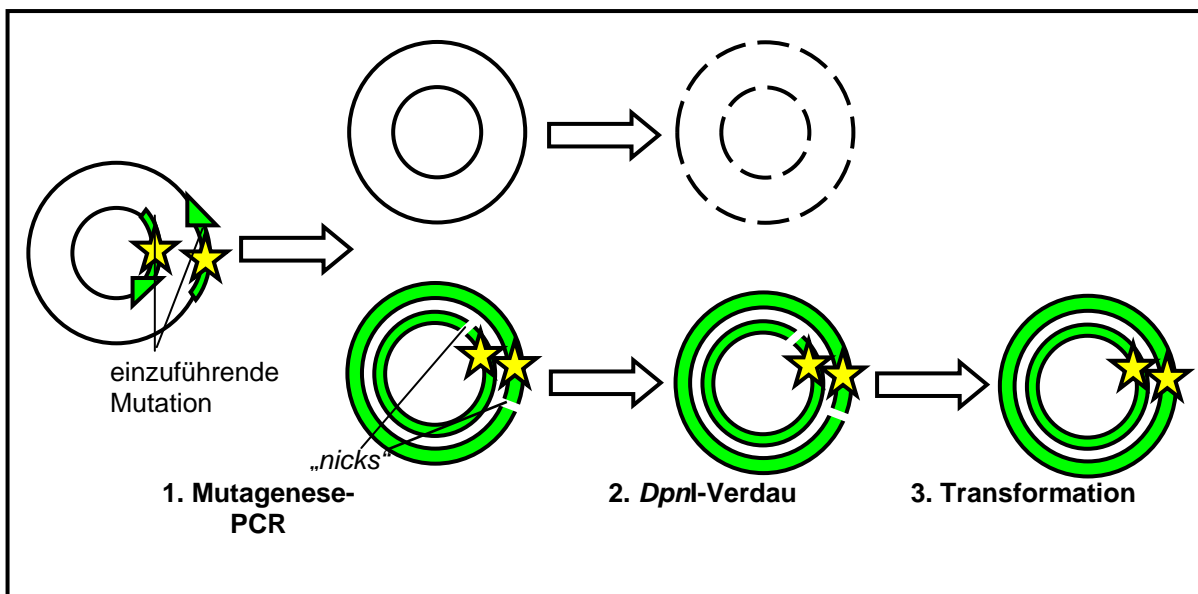


Abb. 6. Überblick über die *QuickChange site-directed mutagenesis*-Methode. Unter 1. sind Ausgangsplasmid mit Zielstellen für die Mutation dargestellt. Hier wird die Plasmid-DNA denaturiert, die komplementären Primer mit der gewünschten Mutation werden angelagert und die DNA wird amplifiziert. Das Ergebnis sind die dargestellten mutierten ungeschlossenen Plasmide („nicks“) 2. DpnI spaltet die methylierten Ausgangsplasmide 3. Bei der Transformation in *E. coli* XL1-Blue Zellen werden die *nicks* ligiert und die mutierten Plasmide vermehrt.

DpnI-Restriktion. Die *DpnI*-Restriktionsendonuklease (Erkennungssequenz 5'-Gm⁶ATC-3') spaltet ausschließlich methylierte und hemimethylierte DNA und wird für die Spaltung unmutierter Ausgangsplasmide eingesetzt. Plasmid-DNA fast aller *E. coli*-Stämme (dam⁺, aber nicht dam⁻) ist methyliert und kann als Ausgangsplasmid für die PCR-Mutagenese eingesetzt werden. *DpnI* ist nicht in der Lage, die in der PCR gewonnenen mutierten „nicked circles“-Amplifikate zu spalten, sodass diese von den Ausgangsplasmiden selektioniert werden können (**Abb. 6**).

4.7 Klonierung

Nach der Klonierungs-PCR wurden die DNA-Amplifikate auf einem Agarose-Gel aufgetragen und nach der Größe aufgetrennt. Die gewünschten Banden (Inserts) wurden aus dem Gel ausgeschnitten und mit Hilfe des *Qiaex II Gel Extraction Kits* (Qiagen) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Die daraus gewonnene DNA wurde durch analytische Agarosegel-Elektrophorese kontrolliert und der Klonierung zugeführt. Durch Ligation wurden die DNA-Inserts in einen Vektor eingefügt. Die Plasmide (Vektor + Insert) wurden in Bakterien transformiert und vermehrt. Mit Hilfe von Selektionsmarkern (Antibiotika-Resistenz) wurden Klone identischer genetischer Ausstattung erzeugt, aus welchen die Plasmid-DNA gewonnen werden konnte.

Das Flussdiagramm (**Abb. 7**) fasst die in dieser Arbeit zur Klonierung verwendeten Methoden zusammen und gibt einen Überblick über die wichtigsten Schritte beginnend mit dem Screening eines Gens bis zur Klonierung und seiner späteren Expression und funktionellen Charakterisierung.

Ligation

Mit Hilfe einer DNA-Ligase wurden die durch *Qiaex II*-gereinigten PCR-Amplifikate in einen Vektor eingefügt. Die Ligation erfolgte entweder über eine gemeinsame Schnittstelle (in den Vektor pBlue-polyA-*Xba*I) oder nach dem Prinzip der T/A-Klonierung (in den Vektor pGEM-T). Zur Ligation in pBlue-polyA-*Xba*I wurde das *Rapid DNA Ligation Kit* (Roche) eingesetzt. Die Inkubation erfolgte entweder bei RT für eine Stunde (*rapid ligation*) oder bei 14°C über Nacht. Zur Ligation in pGEM-T wurde die im *pGEM-T Vector System* (Promega) enthaltende T4 DNA-Ligase eingesetzt. Die beste Ausbeute wurde erhalten, wenn die Proben zuerst bei RT für eine Stunde und danach bei 4°C über Nacht inkubiert wurden. Beide Protokolle wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Der Erfolg der Ligation wurde durch Agarosegelelektrophorese kontrolliert.

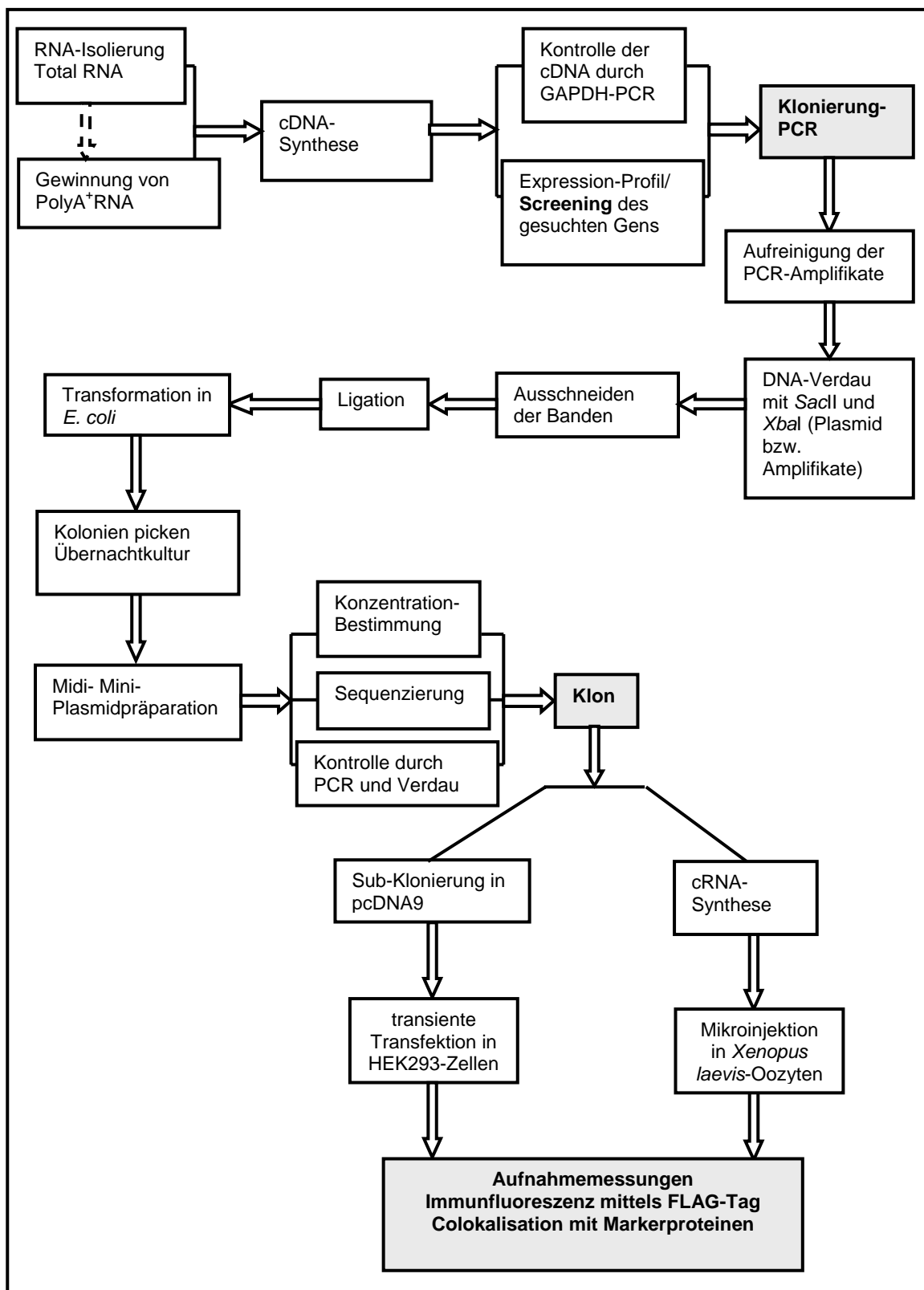


Abb. 7. Vom „Screening zur Funktion“ eines neu identifizierten Gens werden verschiedene molekularbiologische Methoden eingesetzt. Die wichtigsten Schritte sind in diesem Flussdiagramm dargestellt.

Transformation mit blau/weiß-Selektion

Kompetente Bakterien sind in der Lage, durch einen kurzen Hitzepuls Plasmide aufzunehmen. Die Plasmide werden dadurch transformiert und mit Hilfe selektiver Marker in Bakterien vermehrt. In dieser Arbeit wurden für die Transformation die Bakterienstämme *E. coli TOP10 chemically competent cells* (Invitrogen) und *E. coli XL-Blue* (Stratagene) eingesetzt. Die Ligationsansätze wurden zuerst kurz zentrifugiert und auf Eis gestellt. Ein Aliquot der kompetenten Zellen (50 µl) wurden 5 min auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden 1-5 µl der Ligationsansätze in die Bakterien pipetiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben im Wasserbad bei 42°C für 30 s gestellt (Hitzeschock) und rasch wieder auf Eis für 2 min abgekühlt. Danach wurden 250 µl vorgewärmtes SOC-Mediums zugegeben und die Proben im Warmluftschüttelinkubator (225 rpm, 37°C) für 60-90 min inkubiert. Inzwischen wurden die LB-Agarplatten im Brutschrank vorgewärmt. Nach der Inkubation wurden 50 µl und der Rest jedes Ansatzes auf die LB-Platten ausplattiert und über Nacht (max. 16 h) im Brutschrank inkubiert. Die Identifizierung positiver Klone bei der T/A-Klonierung erfolgte über eine blau/weiß-Selektion. Der Vektor *pGEM-T* enthält das *lacZ*-Gen, das für das Enzym β -Galaktosidase codiert. Dieses Enzym spaltet das farblose *X-Gal*, wodurch das blaue *5-Brom-4-Chlor-3-Indigo* gebildet wird. IPTG wirkt als Induktor des *lac* Operons und bewirkt dadurch die benötigte Expression der β -Galactosidase. Wird während der Ligation ein Insert in die *multiple cloning sequence* (MCS) des Vektors eingebaut, wird dadurch der Leserahmen der β -Galactosidase unterbrochen und die Kolonien bleiben weiß (positive Kolonien). Wenn der Vektor sich religiert, ohne dass ein Insert eingebaut wurde, wird die β -Galactosidase exprimiert und es entstehen blaue Kolonien (negative Kolonien).

Animpfen einer Übernachtskultur

Die gewachsenen positiven Kolonien wurden mit sterilen Pipettenspitzen von der Agarplatte gepickt und in Flüssigmedium (LB-Medium mit Ampicillin) abgeworfen und über Nacht bei 37°C im Warmluftschüttelinkubator (225 rpm, 37°C) für 12-16 h inkubiert. Hier wurden die Übernachtskulturen in zwei Maßstäben verarbeitet: 1-5 ml für eine Plasmid-Minipräparation und 25-50 ml für eine Midipräparation.

Anlegen von Glycerinkulturen (Glycerin-Stoks)

Es wurden 1,5 ml Schraubdeckelgefäße mit 150 µl Glycerin verwendet. Zur Lagerung eines Klones wurden 850 µl einer Übernachtskultur mit dem Glycerin vermischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Klonierungs- und Mutagenese-Kontrolle

Bei der Kontrolle einer Klonierung von PCR-Fragmenten oder der Subklonierung zwischen Vektoren wurden die Methoden PCR und Restriktionsverdau eingesetzt. Bei einem Kontrollverdau wurden 0,5 µg Plasmid-DNA mit den Enzymen *SacI* und/oder *XhoI* gespalten. Bei einer Kontroll-PCR wurden 1 µl Plasmid-DNA in 1000 µl Wasser verdünnt und mit dem Enzym *Taq*-Polymerase sowie Gen-spezifischen Primern amplifiziert. Zur Kontrolle der Einführung eines FLAG-Motivs wurde die PCR mit dem Sequenzierungsprimer Oatp2ratF1 und dem Primer KFLAGR durchgeführt. Alle Kontrollansätze wurden durch Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

Sequenzierung der DNA

Die Sequenzierung der DNA-Klone wurde von den Firmen *SeqLab* (Göttingen) und *Genterprise* (Mainz) vorgenommen. Der Sequenzier-Ansatz (6 µl) enthielt 0,5 µg Plasmid-DNA (in 5 µl) in Puffer TrisHCl (10 mM) und 1 µl Primer (10 pM).

4.8 Heterologe Expression in *Xenopus laevis*-Oozyten

Der Vektor pBlue-polyA-*XbaI* enthält vor der *Multiple Cloning Site* (MCS) einen T3-Promotor, der die Anlagerung einer T3-RNA-Polymerase ermöglicht. Diese RNA-Polymerase transkribiert den einklonierten Leserahmen in cRNA (komplementäre RNA) stromabwärts des T3-Promotors einschließlich der PolyA-Sequenz. Die in pGEM-T einklonierten cDNAs trugen keinen PolyA-Schwanz und mussten daher vor der cRNA-Synthese in den pBlue-polyA-*XbaI* subkloniert werden. Die *in vitro* synthetisierte cRNA wird nach der Mikroinjektion von der Translationsmaschinerie der Oozyten als proteincodierende mRNA erkannt und in das entsprechende Protein translatiert.

4.8.1 Linearisierung der Plasmid-DNA und Abschneiden überhängender 3'-Enden

Die Linearisierung erfolgte durch einen Restriktionsverdau mit den Enzymen *XhoI* oder *KpnI*. Beide schneiden stromabwärts der PolyA-Sequenz des pBlue-polyA-*XbaI*-Vektors. Zur Linearisierung wurden 5 µg Plasmid-DNA eingesetzt, mit der in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß der folgende Ansatz angesetzt wurde:

Plasmid-DNA	5 µg
H ₂ O ad	86 µl
10 x <i>NEBuffer</i> 2 (<i>XhoI</i>) oder 1 (<i>KpnI</i>)	10 µl
100 x BSA	1 µl
Enzym (<i>XhoI</i> oder <i>XbaI</i>)	3 µl

Der Ansatz wurde gut gemischt, kurz abzentrifugiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Proben durch Phenol/Chloroform-Extraktion zweimal phenolisiert und anschließend mit Ethanol präzipitiert. Das getrocknete Pellet wurde in 5,5 µl TE-Puffer für 30 min

bei RT gelöst. 0,5 µl dieser Probe wurden in einer Agarose-Gelelektrophorese analysiert und die übrigen 5 µl zur cRNA-Synthese eingesetzt. Die mit *KpnI* linearisierten Plasmide enthalten einen 3'-Überhang, der die *in vitro* cRNA-Transkription stören kann. Daher werden bei derart linearisierten Plasmiden die überhängenden 3'-Enden abgeschnitten. Dazu wurden 5 µg Plasmid-DNA mit 1 µl Klenow-Fragment (NEB) in Anwesenheit von 3,3 µl dNTP-Mix inkubiert. Die Probe wird gut gemischt, kurz abzentrifugiert und für 15 min bei 25°C inkubiert. Anschließend wird die Reaktion durch Zugabe von 2 µl 500 mM EDTA und Erhitzen auf 75°C für 20 min gestoppt. Die dabei entstehende Plasmid-DNA konnte wie eine mit 5'-Überhang linearisierte Plasmid-DNA für die cRNA-Synthese eingesetzt werden.

4.8.2 cRNA-Synthese

Mit Hilfe einer DNA-abhängigen RNA-Polymerase (hier T3-RNA-Polymerase) kann aus einer linearisierten Plasmid-DNA eine komplementäre RNA (cRNA) synthetisiert werden. Die T3 RNA-Polymerase bindet an den T3-Promotor des Vektors und transkribiert den Leserahmen einschließlich der PolyA-Sequenz. Für diese *in vitro* cRNA-Synthese wurde das *Riboprobe in vitro Transcription System* (Promega) eingesetzt.

cRNA-Syntheseansatz

Plasmid-DNA

(linearisiert)	5 µl (5 µg)
Nukleasefreies Wasser	16,25 µl
DDT	5 µl
rATP, rCTP, rUTP je	2,5 µl
rGTP	0,5 µl
Capping Analogue	2,5 µl
RNasin	1,25 µl
5 x Transcriptionspuffer	10 µl
T3-RNA-Polymerase	2 µl

Alle Reagenzien wurden auf Eis pipettiert. Die Ansätze wurden gut gemischt, kurz abzentrifugiert und für 90 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden 1,25 µl RNasin und 1 µl DNase zugegeben und die Ansätze für weitere 15 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 75 µl nukleasefreiem Wasser und 25 µl TE-Puffer gestoppt. Danach wurden die Proben zweimal phenolisiert und anschließend über eine G-50 Sephadex Säule (Roche) gereinigt. Die Säulen wurden nach Angaben des Herstellers vorbereitet. Die cRNA wurde in die Mitte der Säule pipettiert und für 4 min zentrifugiert. Die cRNA wurde durch Zugabe von 13 µl 3 M Na-Acetat und 390 µl 100 % vorgekühltem Ethanol präzipitiert. Die Probe wurde gut gemischt und für 2 h bei

-80°C inkubiert. Anschließend wurde die Probe für 30 min bei 13.200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgezogen. Es wurden 500 µl eisgekühlter Ethanol zugegeben und nicht gemischt. Die Probe wurde dann für weitere 15 min bei 13.200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde tropfenfrei abgezogen und die resultierenden Pellets in der Speed-Vac für 3 min getrocknet. Die Pellets wurden dann in 10 µl RNase-freiem Wasser für 30 min auf Eis gelöst. 1 µl dieser Probe wurde zur Konzentrationsbestimmung und 1 µl zur Qualitätsprüfung mittels Agarose-Gelelektrophorese eingesetzt. Schließlich wurde die cRNA-Lösung auf eine Konzentration von 0,1 µg/µl verdünnt und bei -80°C gelagert.

4.8.3 Froschoperation zur Entnahme der Oozyten

Es wurden weibliche *Xenopus laevis* Frösche eingesetzt. Zur Narkose der Frösche wurde das Anästhetikum MS222 (Aminobenzoessäure-Ethylester, Sigma) als 0,1 %ige Lösung verwendet. Zur Operation wurde ein Frosch für etwa 10 min in die Narkoselösung gelegt. Eine für die Operation ausreichende Narkosetiefe war erreicht, wenn der Frosch sich auf den Rücken drehen ließ. Der Frosch wurde dann auf Eis auf den Rücken gelegt und das Operationsfeld wurde mit befeuchteten Tüchern abgedeckt. Mit einem Skalpell wurde ein 1 cm langer Hautschnitt in lateromedialer Richtung seitlich der Medianen am Abdomen gesetzt. Die Muskulatur wurde mit einer Metzenbaum-Schere angeschnitten. Mit einer spitzen Pinzette wurden die Ovarteile aus dem Bauchraum entnommen und in eine Petrischale mit OR2-Puffer überführt. Die Muskulatur wurde mit Einzelheften mit Vycril 4.0 genäht und der Hautschnitt mit einem U-Heft adaptiert. Der operierte Frosch wurde bis zum Wiedererwachen in ein Gefäß mit Leitungswasser gestellt und anschließend zurück in die Froschbecken gebracht.

4.8.4 Aufbereitung der Oozyten

Die gewonnenen Oozyten wurden mit Hilfe einer Pinzette und einer Platinöse in eine Petrischale mit OR2-Puffer aus dem Ovarlappen vereinzelt. Danach wurden sie in ein 14 ml Rundbodenröhrchen (Falcon tube) überführt und mit 20 mg Kollagenase D für 45-60 min bei 18-20°C behandelt. Anschließend wurden sie 5-mal mit OR2-Puffer und 5-mal mit modifizierter Barth's Lösung gewaschen. Nach dem Waschen wurden die Oozyten nach folgenden Eigenschaften selektioniert:

- scharf getrennte Hemisphären (animaler Pol = schwarz, vegetativer Pol = weiß)
- fleckenlose, glatte Oberfläche
- guter Turgor

Die ausgewählten Oozyten wurden bis zur Mikroinjektion der cRNA in Barth's Lösung bei 18°C gelagert.

4.8.5 Mikroinjektion der Oozyten

Vor der Mikroinjektion wurden die Oozyten erneut aussortiert. Die Injektion erfolgte mit einer elektrischen Nanoliterpumpe. Zuerst wurde eine Glaskapillare (Eingangsöffnung von 20-30 µm) mit einem Puller vorbereitet. Die Kapillare wurde mit Mineralöl gefüllt und auf den Kolben der Nanoliterpumpe aufgesetzt. Dann wurde die Nanoliterpumpe in einem Mikromanipulator befestigt und es wurden 5 µl cRNA bzw. Wasser in die Kapillare aufgezogen. Als Positiv-Kontrolle wurde in den in dieser Arbeit gezeigten Messungen entweder der *Natrium Taurocholate Cotransporting Polypeptide (NTCP) oder der *Sodium Dependent Organic Anion Transporter (SOAT) benutzt. Zur Injektion wurden die Oozyten auf einem feinmaschigen Netz vorgelegt, welches mit Barth's Lösung bedeckt war. Es wurde in den weißen Pol der Oozyten genau 46 nl cRNA (4,6 ng cRNA) bzw. Wasser pro Oozyte injiziert. Die injizierten Oozyten wurden dann in Barth's Lösung für drei Tage bei 18°C inkubiert. Der Puffer wurde täglich gewechselt und dabei abgestorbene Oozyten aussortiert.**

4.8.6 Transportmessung an Oozyten

Drei Tage nach der cRNA-Injektion wurden die Oozyten für Transportmessungen verwendet. Am Tag der Transportmessung wurden sie in natriumhaltigen Transportpuffer gewaschen, in Portionen von 10-15 Stück in 2 ml Reaktionsgefäße überführt (in einem Volumen von 50 µl Transportpuffer) und bis zum Beginn der Messung auf Eis gestellt. Die Messlösung bestand aus einer Mischung radioaktiv markierter und nicht markierter Substanz, welche sich zu einer Gesamtkonzentration addierten (z.B. 3 % [³H]Taurocholat + 97 % Taurocholat in Na⁺-Puffer). Die in Ethanol gelöste radioaktiv markierte Substanz wurde unter Stickstoffbegasung eingedampft und im Na⁺-Puffer gelöst. Es wurden 50 µl dieser Messlösung zu den Oozyten pipettiert und die Transportmessung gestartet. Der Ansatz wurde gut gemischt und für 60 min bei 25°C im Wasserbad inkubiert. Die Aufnahme wurde nach Ablauf der Inkubationszeit durch Zugabe von 1,5 ml eiskalter Stopplösung beendet. Die Stopplösung bestand aus eisgekühltem Na⁺-Puffer. Anschließend wurden die Oozyten zwei weitere Male in je 4 ml Stopplösung gewaschen und vereinzelt. Jeder Oozyt wurde in ein Minivial überführt und mit 500 µl 10 % SDS für 45 min lysiert. Schließlich wurden die Proben durch Vortexen gemischt und in einem Flüssigszintillationscounter ausgezählt. Aus jedem Messwert (in dpm) wurde die Menge der aufgenommenen Substanz in fmol/Oozyte/min berechnet. Die graphische Darstellung erfolgte mit Hilfe Microsoft Excel und für die Statistik wurde GraphPad Prism verwendet.

4.9 Nachweis der Expression mittels FLAG-Tag und Immunfluoreszenz an Oozyten

Bei der heterologen Expression eines Proteins muss mit einer funktionellen Störung des exprimierten Proteins gerechnet werden. Solche Störungen können durch gestörte Faltung oder Insertion in die Zellmembran verursacht werden. Die FLAG-Tag Studien stellen eine sehr hilfreiche Methode dar, um nachzuweisen, ob in einem Expressionssystem ein Protein translatiert wird. Außerdem wurde diese Methode in dieser Arbeit benutzt, um die zelluläre Lokalisation der P7-Proteine zu untersuchen. Durch Mutagenese-PCR wurde ein FLAG-Motiv in die entsprechenden P7-cDNA-Klone eingeführt. Dieses Motiv codiert für ein acht Aminosäuren langes FLAG-Epitop (DYKDDDDK), das von dem Anti-FLAG M2 monoklonalen Antikörper erkannt wird. Dieser Primärantikörper wird wiederum von einem Fluoreszenz-markierten Antikörper (Alexa Fluor 488® *Goat anti-mouse IgG [H+L] conjugate*) erkannt. Der Nachweis des Proteins erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie.

4.9.1 Präparation und Permeabilisierung der Oozyten, primäre Antikörperreaktion

Drei Tage nach der Injektion mit den FLAG-mutierten cRNAs wurde zur Kontrolle der Expressionsfähigkeit der Oozyten cRNA von bereits charakterisierten Transportproteinen, nämlich cRNA des NTCP und SOAT, injiziert und Transportmessungen mit deren Substraten (^3H -Taurocholat bzw. ^3H -Estron-3-sulfat) durchgeführt (Positiv-Kontrolle der Expressions- und Transportsaktivität nach heterologer Expression). Die übrigen injizierten Oozyten wurden zur FLAG-Immunfluoreszenz eingesetzt. Zuerst werden die Oozyten in eisgekühlter K^+ -Aspartat-Lösung gelegt und für 5 min bei 4°C inkubiert. Mit zwei feinen Pinzetten (Dumont Medical 5/45) wurde die Vitellinmembran entfernt und die Oozyten wurden in Barth's Lösung zurückgelegt. Dann wurden sie in 2 ml Dent's Fixans bei -20°C für 4 h permeabilisiert. Anschließend wurden die permeabilisierten Oozyten in 1 ml einer absteigenden Methanol-Reihe (90 %, 70 %, 50 %, 30 % in PBS) je 10 min inkubiert und danach dreimal für 10 min in *Blocking solution* PBSAG (PBS + 2 % BSA + 4 % Goat serum) gewaschen, um unspezifische Bindungen zu blockieren. Inzwischen wurde der primäre Antikörper Anti-FLAG M2 1:1000 in PBSAG-Puffer verdünnt. Es wurden 500 µl des verdünnten primären Antikörpers pro Oozyten-Gruppe pipettiert. Die primäre Antikörperreaktion erfolgte über Nacht bei 4°C.

4.9.2 Sekundäre Antikörperreaktion

Am nächsten Tag folgten 11 Waschschrte in jeweils 2 ml PBS: 3 x 5 min, 3 x 15 min, 3 x 30 min und 2 x 1 h. Der sekundäre Antikörper Alexa Fluor 488 wurde 1:500 in PBSAG verdünnt und davon wurden 500 µl in jede Oozyten-Gruppe pipettiert. Die Oozyten wurden bei RT für 2 h unter Lichtabdeckung inkubiert. Alle weiteren Schritte wurden ebenfalls unter Lichtabdeckung

vorgenommen, um den Fluoreszenzfarbstoff zu schützen. Schließlich wurden die Oozyten 6 x 10 min und anschließend über Nacht mit jeweils 2 ml PBS gewaschen.

4.9.3 Fixierung und Einbettung der Oozyten

Am nächsten Tag wurden die Oozyten in 2 ml 3,7 % Formaldehyd für 30 min nachfixiert und anschließend mit einer aufsteigenden alkoholischen Reihe (30 %, 50 %, 70 % Ethanol in PBS und 100 % Ethanol) je 30 min entwässert.

Die Oozyten wurden dann in 2 ml Infiltrationslösung A für 2 h bei RT inkubiert. Nach Ablauf der Inkubation wurde die Infiltrationslösung A abgezogen und die Oozyten in 2 ml Infiltrationslösung B für weitere 2 h bei RT inkubiert. Danach wurde die Infiltrationslösung B erneuert und die Oozyten über Nacht bei 4°C inkubiert. Als Gussform für die eingebetteten Oozyten wurden 1,5 ml Reaktionsgefäße verwendet. Diese wurden zuerst mit 150 µl Infiltrationslösung B + Härter II (im Kit enthalten) befüllt und als Vorlage benutzt, damit die Oozyten alle auf einer Ebene lagen und nicht in die Spitze des Röhrchens sedimentierten. Die vorbereiteten Gefäße wurden über Nacht ausgehärtet.

4.9.4 Einbettung der Oozyten und Schneiden der Präparate

Am nächsten Morgen wurde die Infiltrationslösung B erneuert, anschließend sauber abgezogen und durch 2 ml Infiltrationslösung B + Härter II ersetzt. Die Oozyten wurden in Gruppen von 5-6 Stück rasch in die vorbereiteten Gussformen überführt und so angeordnet, dass sie nebeneinander auf der Vorlage lagen. Die Gefäße wurden bei RT ausgehärtet.

Nach dem Aushärten des Kunststoffs wurden die Reaktionsgefäße mit zwei Zangen aufgeschnitten und die Kunststoffkegel mit den Oozyten entnommen. Mit einer feinen Säge wurde die Spitze der Kegel soweit abgeschnitten, dass die Oozyten am Rand zu sehen waren aber noch nicht angeschnitten wurden. Die Kegel wurden mit Karosseriespachtelmasse in Einbettkassetten fixiert. Nach dem Aushärten der Spachtelmasse wurden die Präparate mit Hilfe eines Mikrotoms (Institut für Veterinär-Pathologie) geschnitten. Zuerst wurden 10 µm Schnitte bis zur Oozyten-Grenze angefertigt dann 5 µm Schnitte für die weitere Untersuchung. Jeder Schnitt wurde mit einer Pinzette vom Messer entnommen und zuerst in Wasser entspannt. Die Schnitte wurden auf einen Objektträger auf die Oberfläche eines Wassertropfen gegeben und mit einem Pinsel entfaltet. Die Präparate wurden bei RT getrocknet und mit Deckgläschen und Histokit (Roth) eingedeckelt. Die Präparate wurden unter einem Fluoreszenzmikroskop (Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie) bei einer Wellenlänge von 488 nm begutachtet.

4.10 Northern Blot

Der Northern Blot ermöglicht den Nachweis der Genexpression auf RNA-Ebene sowie eine Größenbestimmung eines mRNA-Transkripts. Bei der Northern Blot-Analyse können RNA-Stränge (Total-RNA oder polyA⁺-RNA) mit markierten RNA- oder DNA-Sonden hybridisiert werden. Der Nachweis erfolgt durch Autoradiographie.

4.10.1 Agarose/Formaldehyd-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der polyA⁺-RNAs erfolgte durch Elektrophorese in einem Agarose/Formaldehyd-denaturierenden Gel. Um Kontaminationen mit RNasen zu minimieren, wurden Arbeitsfläche, Elektrophoresekammer und Gelschlitten mit 70 % Ethanol und DEPC-behandeltem Wasser abgewischt. Alle Puffer wurden mit DEPC-Wasser angesetzt. Um das Gel vorzubereiten, wurde 1 g Agarose in 62 ml DEPC-Wasser und 20 ml 5 x MOPS-Puffer ([N-morpholino]-2-hydroxypropanesulfonic acid, pH 7,0) vermischt und durch Kochen gelöst. Diese Lösung wurde dann auf 55°C abgekühlt, mit 50 ml Formaldehyd versetzt, gut gemischt und in eine Gel-Kammer gegossen. Während des Auspolymerisierens wurden die Proben vorbereitet. Pro Ansatz wurden 3 µg polyA⁺-RNA verwendet. Jede Probe wurde mit 2 x RNA-Probenpuffer vermischt und bei 65°C für 5 min denaturiert. Anschließend wurden die Proben auf Eis gestellt, und es wurde 2 µl RNA Loading Dye pipettiert. Die Proben wurden auf dem Gel aufgetragen. Als Laufpuffer wurde 1 x MOPS-Puffer verwendet. Die Proben liefen zuerst bei 20 mA in das Gel ein und dann bei 30 mA und 70 V für ca. 2-3 h.

4.10.2 Übertragung der RNAs auf eine Nylonmembran (*Transferring*)

Nachdem die RNAs durch Elektrophorese aufgetrennt worden waren, erfolgte die Übertragung auf eine Nylon-Membran. Nach der Elektrophorese wurde in diesem Fall auf die Ethidiumbromid-Färbung verzichtet, weil diese beim Blotten die Effizienz der RNA-Übertragung stört. In dieser Arbeit wurde das Brücke-Modell verwendet (**Abb. 8**).

Das Gel wurde zuerst in DEPC-Wasser für 15 min durch Schwenken gespült, um das Formaldehyd zu entfernen. Danach wurde das Gel zweimal in 10 x SSC für 15 min getränkt. Währenddessen wurden Papiertücher, Blotting-Papier und Nylonmembran zugeschnitten. Papiertücher und Blotting-Papier wurden 2-3 mm kleiner als die Gelgröße zugeschnitten, damit sie die Brücke nicht berührten. Die Nylonmembran entsprach der genauen Größe des Gels. Das Blott-Paket wurde, wie in **Abbildung 8**, aufgebaut. Die Nylonmembran wurde nur mit einer Pinzette berührt.

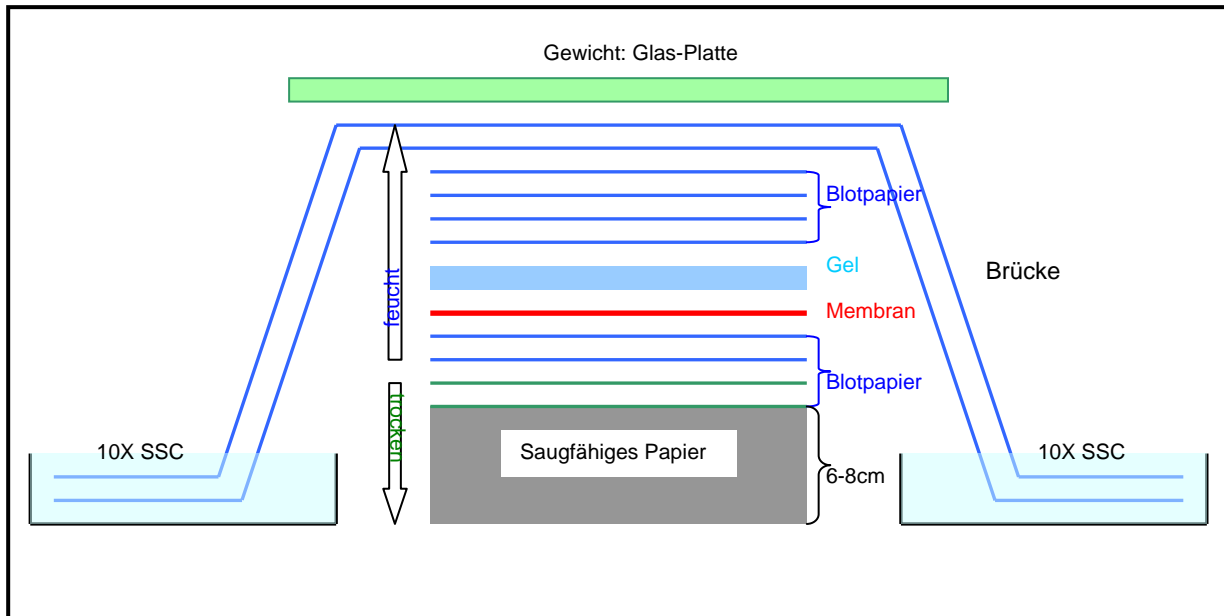


Abb. 8. Das Brücke-Modell. Das dargestellte Blotting-Papier sowie die Brücke und die Nylonmembran wurden in 10 x SSC getränkt. Als Gewicht wurde eine Glasplatte verwendet.

Mit den Papiertüchern wurde ein Stapel errichtet, auf dem das Blotpapier aufgestellt wurde. Beim Aufbauen werden die Luftblasen, die sich zwischen den Papieren bilden, mit einem runden Gegenstand weggeschoben. Es wurde über Nacht bei RT geblottet. Am nächsten Tag wurde das Blot-Paket abgebaut. Die Taschen des Gels wurden zur späteren Wiedererkennung mit einem Bleistift markiert. Die Nylonmembran wurde mit einer Pinzette von dem Stapel entnommen und in 10 x SSC für 5 min gewaschen, um Agarose-Reste zu entfernen. Zwischendurch wurde das Gel zur Kontrolle der Übertragung in Ethidiumbromid gefärbt und fotografiert. Bei einer erfolgreichen Übertragung ist auf dem Gel außer dem Längenstandard nichts zu sehen. Die Nylonmembran wurde nach dem Waschen 5 min an der Luft getrocknet. Anschließend wurde sie mit UV-Licht im UV-Crosslinker *Stratalinker* (Stratagene) bei 1200 joules bestrahlt. Die fixierte Membran wurde schließlich zwischen zwei Blot-Papiere gelegt und von Alufolie umgeben. Die so eingepackte Nylonmembran wurde bei RT zur späteren Hybridisierung aufbewahrt.

4.10.3 Erstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden

Die Sonden werden aus Plasmid-DNA durch PCR amplifiziert. Als Template wurden 50 ng Plasmid-DNA eingesetzt. Im Anschluss an die PCR-Amplifikation wurden die Proben auf ein Endvolumen von 100 µl mit Wasser aufgefüllt, in einer Agarosegel-Elektrophorese kontrolliert und anschließend mit dem *High Pure PCR Purification Kit* (Roche) aufgereinigt. Die Konzentration der Proben wurde in einem Photometer bestimmt.

Die durch PCR amplifizierten Sonden werden nach dem Prinzip der Nick-Translation (*Nick Translation Kit*, Amersham Biosciences) mit $\alpha[^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ (Amersham) markiert. Das Enzym-Mix dieses Kits enthält eine DNase I (10 pg/µl) und eine *E. coli* DNA polymerase I (0,5 U/µl), die eine

5'-3' Polymerase- sowie eine 5'-3' Exonuklease-Aktivität besitzt. Die DNase I verursacht zufällige Einzelstrangbrüche (*nicks*) in der DNA, welche von der DNA Polymerase I wieder aufgefüllt werden (siehe **Abb 9**). Wenn diese Reaktion neben den gewöhnlichen dNTPs in Anwesenheit von markierten Nukleotiden stattfindet, werden diese (in diesem Fall $\alpha[^{32}\text{P}]\text{dCTP}$) mit eingebaut und somit die DNA-Sonde radioaktiv markiert.

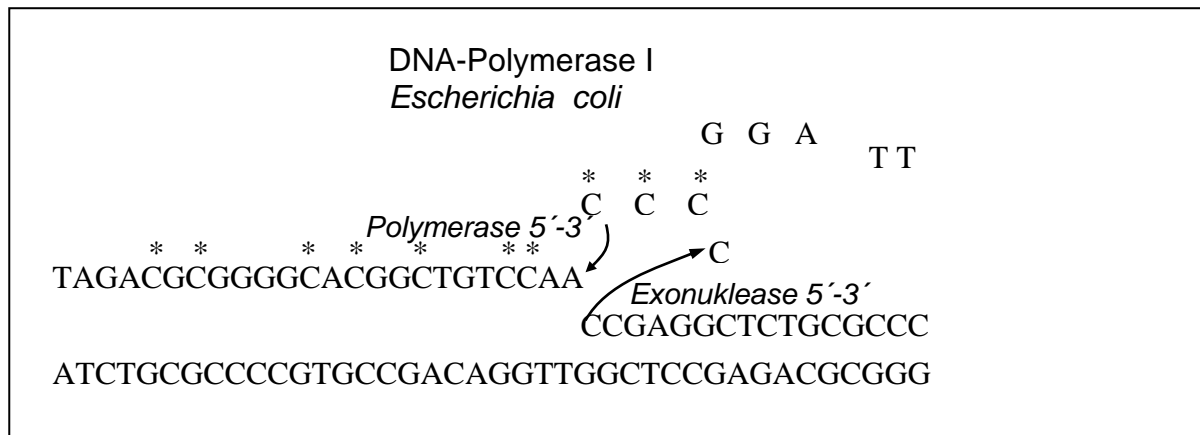


Abb. 9. Das „Nick-Translation“ Prinzip kombiniert die Eigenschaften der *E. coli* DNA-Polymerase I: Die Polymerase synthetisiert ein neues Nukleotid an dem 3'-Ende eines Nukleotidstranges und die Exonuklease hydrolysiert das 5'-Ende eines Nukleotidsstrangs. In der Folge werden radioaktiv markierte Nukleotide eingebaut.

Ansatz. Als Ausgangsprobe wurden 50-150 ng DNA-Sonde verwendet. Anschließend wurden die anderen Reaktionskomponenten wie folgt pipettiert:

DNA-Sonde	1 μl (50-150 ng)
dTTP, dATP, dGTP jeweils	1,3 μl
Enzym-Mix	
(1,25 U DNA-Polymerase I; 25 pg DNase I)	2,5 μl
$\alpha[^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ (25 μCi)	2,5 μl
Wasser auf	20 μl

Die Proben wurden bei 15°C im Wasserbad für 2 h inkubiert. Währenddessen wurden G-50 Sephadex *Quick Spin* Säulen (Roche) vorbereitet. Die Säulen wurden zuerst kräftig geschüttelt, bis der Puffer resuspendiert war und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gestellt. Nachdem der Puffer durchgelaufen war, wurden die Säulen bei 1100 x g für 2 min zentrifugiert. Danach wurden die Säulen in ein neues Reaktionsgefäß gesetzt. Nach der Inkubation der Proben wurde die Reaktion durch Zugabe von 80 μl TES-Puffer gestoppt. Das gesamte Probenvolumen (100 μl) wurde in die Mitte der Säule pipettiert und bei 1100 x g für 4 min zentrifugiert. Das Eluat enthielt die gereinigte radioaktiv markierte Probe. Die Proben wurden bei -20°C gelagert oder gleich denaturiert.

4.10.4 Hybridisierung

Die Nylonmembran wurde in 5 x SSC-Puffer 2 min getränkt. Anschließend wurde die Nylonmembran in eine Hybridisierungsflasche gelegt und mit vorgewärmter (42°C) Prähybridisierungslösung bei 42°C für 1-2 h im Hybridisierungssofen inkubiert. Währenddessen wurde die radioaktiv markierte Sonde bei 95°C für 5 min denaturiert und sofort auf Eis gestellt. Die denaturierte Sonde wurde mit 12 ml Hybridisierungslösung (vorgewärmt auf 42°C) vermischt. Die Prähybridisierungslösung wurde verworfen und die Hybridisierungslösung auf die Membran pipettiert. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 42°C in einem Hybridisierungssofen. Am nächsten Morgen wurde die Membran aus der Hybridisierungsflasche entnommen, zweimal in 300 ml *Stringency Wash Solution* I (SWS I) für 5 min bei RT gewaschen und danach zweimal in 300 ml SWS II bei 68°C im Hybridisierungssofen gewaschen. Anschließend wurde die Membran in eine Autoklaviertüte eingeschweißt und auf einen Röntgenfilm aufgelegt. Der Film wurde bei -70°C für 1 bis 5 Tage exponiert. Nach der Exposition wurde der Film im Fotolabor entwickelt.

4.11 Subklonierung in den Vektor pcDNA9

Zur Expression in Säugertierzellen müssen zuerst die gewünschten Leserahmen in einen geeigneten Vektor eingeführt werden. In dieser Arbeit wurden die P7-cDNA-Sequenzen von Ratte und Mensch in den Vektor pcDNA9 subkloniert. Der Vektor pcDNA9 enthält eine FRT-Sequenz (*FLP-Recombination Target*), die von einer Flp-Rekombinase erkannt wird. Wenn der Vektor gemeinsam mit dem Plasmid pOG44 transfiziert wird (Flp-In System, Invitrogen), wird das gewünschte Gen durch homologe Rekombination in das Genom der Wirtszellen integriert. Der Vektor pcDNA9 enthält zusätzlich zwei Tetrazyklin Operone (TetO₂) stromabwärts des CMV-Promotors und ermöglicht damit eine durch Tetrazyklin induzierbare Genexpression.

PCR-Ansatz, Verdau und Subklonierung. Als Ausgangsproben wurden die im pBlue-polyA⁺-XbaI Plasmid klonierten cDNAs von Ratte- und Mensch-P7 benutzt. Durch PCR wurden mit mutierten Primern die Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme *KpnI* (vorwärts) und *XhoI* (rückwärts) an beiden Seiten des Leserahmens eingefügt. Die PCR-Amplifikate und der Zielvektor wurden mit den Enzymen *KpnI* und *XhoI* verdaut und mittels präparativer Agarose-Gelelektrophorese aufgereinigt. Danach wurden die ausgeschnittenen P7-cDNAs in den Vektor pcDNA9 ligiert. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 4°C. Am nächsten Tag wurden die Ligationsansätze mit Hilfe des *High Pure PCR Product Purification* (Roche) Kits unter Angaben des Herstellers gereinigt und zur Transformation in TOP10 *E. coli* eingesetzt. Aus den gewachsenen Bakterien wurden Plasmid-Präparationen im großen Maßstab (Midi) durchgeführt. Die Plasmid-DNA wurde schließlich sequenziert und bei -20°C bis zur Transfektion gelagert.

4.12 Transiente Transfektion in HEK293-Zellen

Für die transiente Transfektion wurden HEK293-Zellen (*human embryonic kidney cells*; transformiert durch Adenovirus Typ 5) eingesetzt. Für Transfektionsexperimente wurden $0,25 \times 10^6$ pro Well einer 24-Well-Platte ausgesät. Die Zellen wurden auf mit Poly-D-Lysin vorbeschichteten Deckgläschen ausgebracht und über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

Ein Tag nach der Aussaat bzw. wenn die Zellen 90-95 % konfluent waren, wurden sie mit der gewünschten Plasmid-DNA transfiziert. Am Tag der Transfektion wurde weder FKS noch Antibiotika verwendet, da sie die Effizienz der Lipofectamin 2000 (Invitrogen) Transfektion stören könnten. Lipofectamin ist ein lipophiles, membrangängiges Molekül, das mit Plasmid-DNA vermischt wird und dadurch einen Komplex bildet. Die DNA-Liposomen-Komplexe binden an die Zelloberfläche und gelangen dann über unspezifische Endozytose in das Zytoplasma.

Transfektionsansatz. Das Verhältnis DNA (in µg) zu Lipofectamin (in µl) betrug 1:2 bis 1:3. Für jede Probe wurden die zwei folgenden Ansätze vorbereitet:

1. Plasmid-DNA	0,8-1 µg
in Medium ohne FKS und Antibiotika	
auf ein Endvolumen von	50 µl
2. Lipofectamin® 2000	2 µl
in Medium auf ein Endvolumen von	50 µl

Beide Ansätze wurden separat gemischt und bei RT für 5 min inkubiert. Danach wurde die gelöste DNA mit dem gelösten Lipofectamin vermischt (Endvolumen 100 µl) und bei RT für 30 min inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Ansätze in jedes Well zu den HEK-Zellen gegeben und durch Bewegung der Platten gemischt. 6 h nach der Transfektion wurden die Zellen durch Zugabe von 1 ml Tetrazyklin (100 µg/ml) über Nacht induziert. Schließlich wurden die transfizierten Zellen bei 37°C unter 5 % CO₂ für 48 h inkubiert. Die durch Lipofectamin transfizierten Zellen wurden in dieser Arbeit sowohl zur Transportmessung als auch zur Immunfluoreszenz eingesetzt.

4.13 Indirekte Immunfluoreszenz in HEK293-Zellen

Die in dieser Arbeit verwendeten primären und sekundären Antikörper und ihre Verdünnungen sind:

Anti-FLAG M2 Maus	1: 200
Anti-FLAG Kaninchen	1: 40.000
Anti-Calnexin Kaninchen	1: 600

Anti-Pan-Cadherin Maus	1: 500
Anti-HA M2 Maus	1: 200
Alexa Fluor 488 Ziege	1: 200
Cy3 Ziege	1: 800
Anti-Actin Kaninchen	1: 250
WGA (Weat Germ Agglutinin)	1: 500

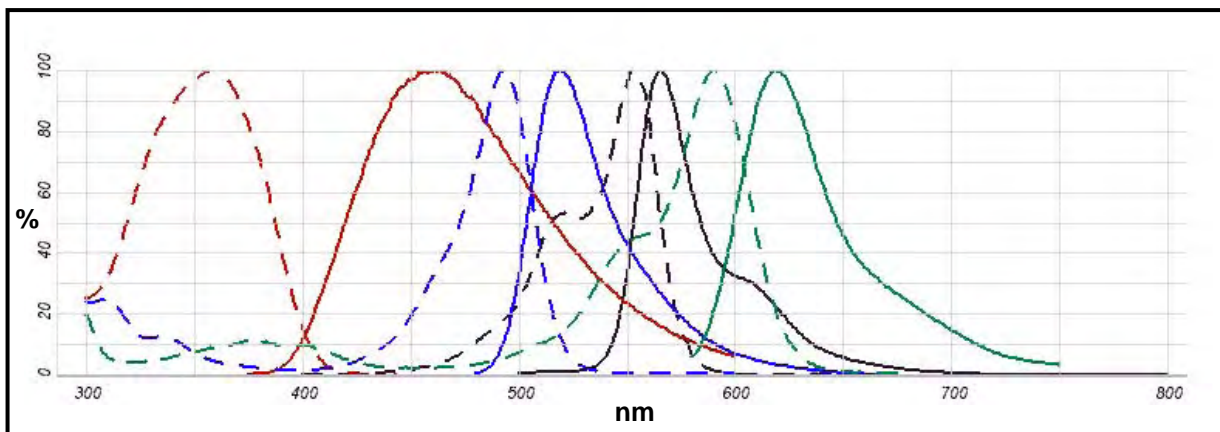


Abb. 10. Die Anregungs- (gestrichelte Linien) und Emissionskurven (kontinuierliche Linien) sind für die in dieser Arbeit verwendeten Fluorophore mit Hilfe des Programms Spectraviewer (<http://probes.invitrogen.com/resources/spectraviewer/>) in Farben dargestellt. rot: DAPI; blau: Alexa Fluor 488; schwarz: Cy3; Grün: Alexa Fluor 594.

Die auf Deckgläschen transient transfizierten HEK293-Zellen wurden zuerst mit 1 x PBS gewaschen. Danach erfolgte eine 15-minütige Fixierung mit einer 4 % Paraformaldehydlösung. Nach zwei Waschschritten mit 1 x PBS bei RT wurden die Zellen in Puffer A 5 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 5 min mit 0,2 % Triton-X-100 in Puffer A permeabilisiert. Zur Blockierung unspezifischer Bindungen wurden die Zellen in Blockierungslösung, bestehend aus 1 % BSA und 4 % Ziegenserum, für 30 min bei RT belassen. Die Inkubation mit dem in Blockierungslösung verdünnten primären Antikörper erfolgte über Nacht bei 4°C. Am nächsten Tag, nach dreimaligem Waschen mit 1 x PBS, erfolgte unter Lichtabdeckung die Inkubation mit dem in Blockierungslösung verdünnten sekundären Antikörper für 1 h bei RT. Nach der Inkubation wurden die Zellen dreimal 5 min mit 1 x PBS bei RT gewaschen. Anschließend wurden sie mit DAPI/Methanol 1:5000 zuerst gewaschen, danach für 5 min inkubiert und schließlich mit reinem Methanol 5 min gewaschen. Die Deckgläschen wurden aus den Wells entnommen und an der Luft getrocknet. Anschließend wurden sie in Mowiol eingebettet, im Fluoreszenzmikroskop (Leica DM 6000B) betrachtet und mit Hilfe der Programme FW4000 V1.2 *Fluorescence Workstation* und Deblur V2.3.2 *Deconvolution* und *3D-Reconstruction* von Leica Microsystems, ausgewertet und dokumentiert.

5. Ergebnisse

5.1 Klonierung des P7 von Mensch, Ratte, Maus und Frosch

5.1.1 Die *in silico* Identifizierung der P7-Proteine

Um weitere SLC10 verwandte Sequenzen zu finden, wurde zunächst eine so genannte *in silico* Klonierung (**Abb. 11**) eingesetzt. Dafür wurden als Suchanfrage die Protein- und Nucleotid-Sequenzen der bisher charakterisierten Mitglieder der SLC10-Familie, NTCP und ASBT, verwendet. Durch eine Megablast-Analyse auf DNA- (BLASTN) und Proteinebene (BLASTP) wurden zahlreiche *Expressed Sequence Tags* (ESTs) sowie hypothetische unbekannte Leserahmen, welche mehr als 15 % Sequenzidentität zu den bekannten SLC10-Mitgliedern zeigten, gefunden. Diese Sequenzen (ca. 100 von Wirbeltieren und Bakterien) wurden danach mit Hilfe verschiedener bioinformatischer Verfahren kontrolliert, verglichen und in Subfamilien eingeordnet. Das Ergebnis dieser Analyse war die Vorhersage von vier neuen Proteinen, welche der SLC10-Transporterfamilie zugeordnet wurden (SLC10A3-SLC10A6). Weiterhin wurde gezeigt, dass ein siebtes Säugetierprotein (P7-Protein) existiert, welches nur geringe Sequenzidentität zu den restlichen SLC10-Mitgliedern zeigte. Trotzdem gab es zu diesem Zeitpunkt (Jahr 2003) keine andere annotierte Sequenz, die zu P7 ähnlicher gewesen wäre als die SLC10-Carrier. P7-Gene wurden für Mensch, Ratte, Maus und *Xenopus laevis* gefunden (**Tab. 3**). Die Sequenz der Ratte wurde aus zwei hypothetischen kürzeren Leserahmen (XM_214664 und XM_344755) zusammengefügt.

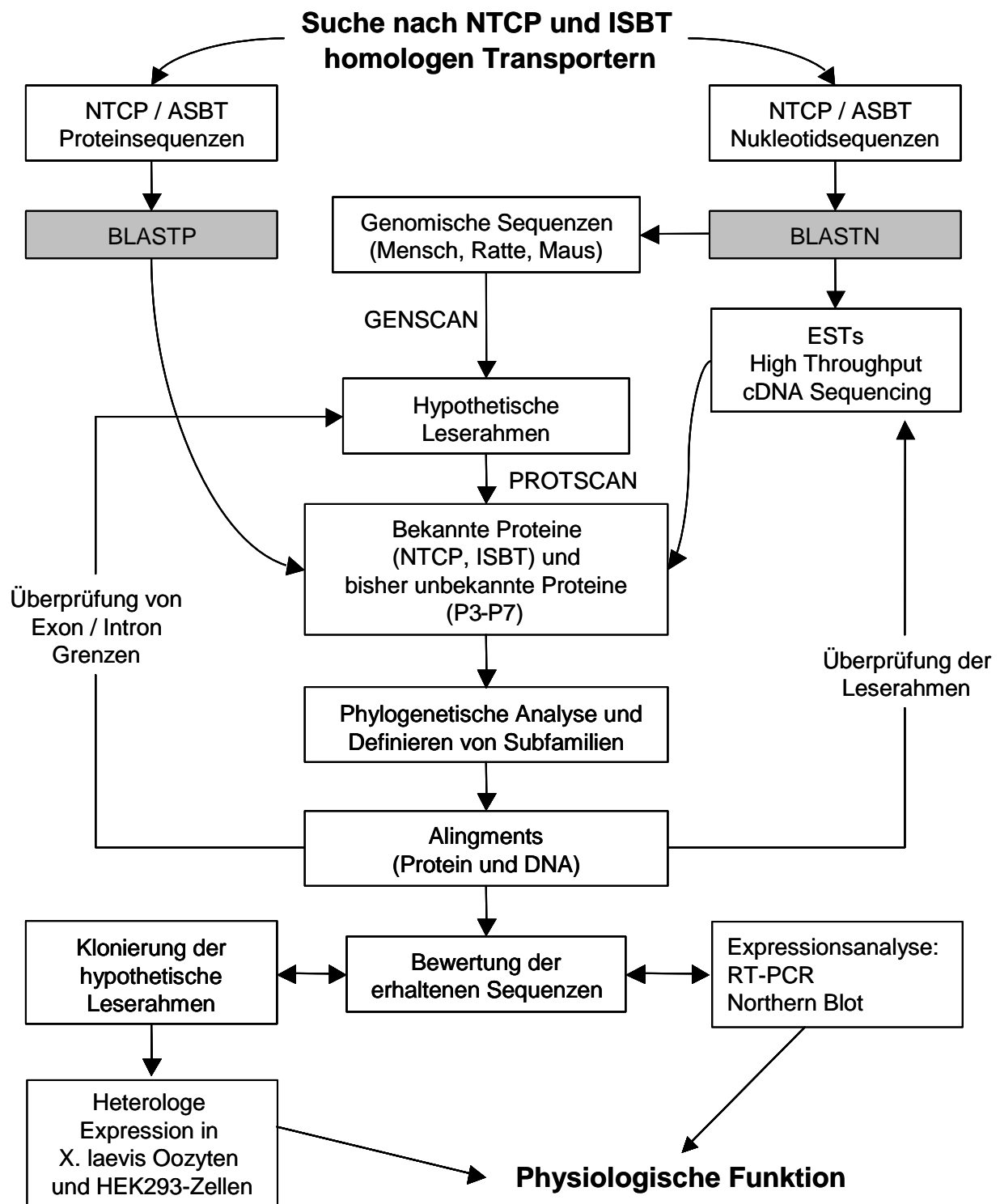


Abb. 11: Die *in silico* Klonierungsstrategie zur Identifizierung neuer Mitglieder der SLC10-Familie. Als Suchanfrage wurden die Nucleotid- und Protein-Sequenzen von NTCP und ASBT zu einer BLAST-Analyse (*Basic Local Alignment Search Tool*) eingesetzt.

Tab. 3: *In silico* identifizierte P7-Proteine von Mensch, Maus, Ratte und Frosch. Ergebnis nach dem in Abbildung 11 dargestellten Suchverfahren.

Spezies/ Bezeichnung	GenBank Acc. No.	Synonyme	Gewebe-Expression ²
<i>Homo sapiens</i> P7	AK075364	<i>H. sapiens</i> cDNA PSEC0051 fis, clone NT2RP2000168; DKFZp566M114	Testis; Gehirn; Gefäßsystem; Magen; Plazenta; Pankreas; Lymphknoten; Kolon; Leber; Auge; Niere; Milz; Trachea; Uterus; Muskel; Lunge; Prostata; Fett; Schilddrüse; Thymus; Haut; Knochen; Ovar
<i>Mus musculus</i> mP7	XM_134313 ¹	<i>M. musculus</i> RIKEN cDNA 2410193C02 gene	Knochenmark; Lunge ; Kopf; Mamma; Thymus; Zerebellum; Milz; Haut; Pankreas; Ovar; Uterus; Dünndarm; Gehirn; Testis; Niere; Leber
<i>Rattus norvegicus</i> rP7fus³	XM_214664 ¹ XM_344755 ¹	<i>R. norvegicus</i> hypothetical LOC291942	Embryonales Gewebe; Testis; Lymphknoten; Ovar; Nervengewebe; Ohr
<i>Xenopus laevis</i> xP7	BC056022	<i>X. laevis</i> hypothetical protein MGC68691, dkfzp566m114	Embryo Stadium 31/ 32, Gehirn

¹ Die Sequenzen von Ratte und Maus wurden mit Hilfe von Computerprogrammen berechnet und sind daher nur hypothetisch.

² Die Gewebe-Expression bezieht sich auf EST-counts nach Information von UniGene der NCBI.

³ rP7 Fusionsprotein: Ratte P7 wurde aus zwei kürzeren Leserahmen zusammengesetzt.

5.1.2 Klonierung der Leserahmen und genomische Organisation der P7-Gene

Zunächst wurde die *in vivo* Transkription der P7-Gene nachgewiesen. Dafür wurde mit Hilfe sequenzspezifischer Primer eine RT-PCR aus verschiedenen Geweben von Mensch, Ratte, Maus und Frosch durchgeführt. Die Gewebe, in denen für P7 die stärkste Expression zu sehen war, wurden für die Klonierung eingesetzt. Während bei Ratte und Maus nur eine spezifische Bande bei 1023 bp zu sehen war, wurde bei Menschen eine zusätzliche Bande von ungefähr 1100 bp detektiert (**Abb. 12**). Diese wurde als P7-X-Bande bezeichnet. Für *Xenopus laevis* wurde aus dem Dünndarm eine 1032 bp lange cDNA kloniert.

Für jedes Transkript wurden mindestens drei verschiedene cDNA-Klone sequenziert. Die Sequenzen der vier Spezies wurden in der GenBank Sequenz-Datenbank eingetragen: DQ122860 (Mensch-P7), AY825926 (Maus-P7), AY825929 (Ratte-P7) und DQ122862 (*Xenopus laevis*-P7). In **Tabelle 4** sind die molekularen Eigenschaften der vier klonierten cDNA-Sequenzen aufgelistet.

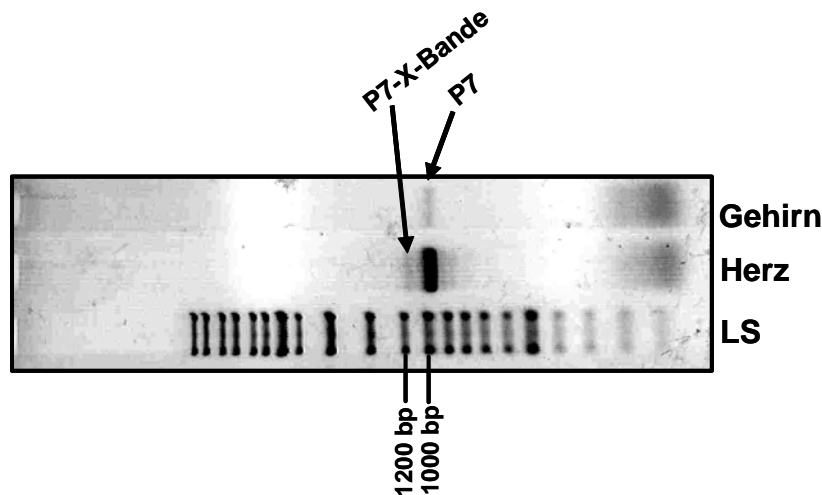


Abb. 12: Ergebnisse der RT-PCR zur Klonierung von P7 aus Herz und Gehirn des Menschen. Das erwartete Amplifikat (~1023 bp) kam im Herz und Gehirn vor. Im Herz wurde eine zusätzliche Bande (P7-X-Bande) nachgewiesen. Beide Amplifikate wurden in einer präparativen Agarose-Gelelektrophorese aufgereinigt und in einen T/A-Vektor kloniert. LS: Längenstandard.

Tab. 4. Molekulare Eigenschaften der klonierten P7 cDNA-Sequenzen von Mensch (h), Ratte (r), Maus (m) und Frosch (x).

Protein/ Spezies	GenBank Acc. No.	cDNA (bp)	Protein ID	Protein (AS)	MW (kDa)	Chr.	kloniert aus
hP7 <i>Homo sapiens</i>	DQ122860	1023	AAZ32256	340	37.4	4q31.21	Herz
mP7 <i>Mus musculus</i>	AY825926	1023	AAV80709	340	37.3	8C1	Leber
rP7 <i>Rattus norvegicus</i>	AY825929	1023	AAV80712	340	37.3	19q11	Dickdarm
xP7 <i>Xenopus laevis</i>	DQ122862	1032	AAZ32258	343	37.9	-	Dünndarm

Das humane P7-Protein hat ein vorhergesagtes Molekulargewicht (MW) von 37.4 kDa. Die Aminosäuresequenz zeigt 13.8 % bzw. 13.5 % Identität zu NTCP und ASBT.

Die 340 Aminosäuren langen P7-Proteine von Mensch, Ratte und Maus zeigen untereinander eine Sequenzidentität von über 94 %. Das P7 Protein von *Xenopus laevis* besteht aus 343 Aminosäuren und ist mit den Säugetierproteinen außergewöhnlich stark verwandt (> 85 % Sequenzidentität). Die Bestimmung der Exon/Intron-Strukturen der *P7*-Gene erfolgte durch einen Vergleich der klonierten cDNA-Sequenzen mit den genomischen Sequenzen von Mensch, Ratte und Maus. Das *P7*-Gen besteht aus 12 kodierenden Exonen (**Tab. 5**), welche 266 kb bzw. 222 kb auf den Chromosomen 4q31 des Menschen und 8C3 der Maus umspannen.

Tab. 5. Intron/Exon-Organisation des humanen P7-Gens auf dem chromosomalen Locus 4q31.21 (GenBank NC_000004.10).

Exon	Länge (bp)	5'-Spleiß-Donor	3'-Spleiß-Akzeptor	Intron (kb)
1	100	ATGGGG/gtaagt	tttttag/GACCAC	4.4
2	83	ACAGAG/gtactg	ttccag/GAGCTG	6.9
3	137	AAAAGG/gtatgt	tttcag/TTTGCA	5.9
4	76	AATGAG/gtgagt	tcatag/GCAGCT	61
5 ^a	39	TTTTTG/gtaagt	tttcag/GGCATC	11.6
6	36	CTTTTT/gtgagt	ttacag/CTTGGT	19.9
7	84	GGACAG/gtaagg	tttcag/ATTGTC	11.8
8 ^b	166	TCATAA/gtaagt	cttcag/TATTTT	0.9
9 ^b	52	AACAAG/gtaagt	ccctag/GAATAA	9.6
10	74	CATTGG/gtaagt	caacag/GAATTC	24.3
11	146	CAGAAG/gtgagt	gtgtag/AAACTA	1.7
11' ^c	110	CTCCAG/gtatcc	ttgtag/GGAGTG	0.3
12	30	GTATAA	-	-

Die in Großbuchstaben geschriebenen Sequenzen entsprechen exonischen Sequenzen, kleingeschriebene Buchstaben entsprechen intronischen Sequenzen.

^a Exon 5 ist in P7 Variante 4 nicht enthalten; ^b Exone 8 und 9 sind in P7 Variante 2 nicht enthalten; ^c Exon 11' kommt nur in P7 Variante 3 vor.

Die *P7*-Gene von Maus und Ratte sind auch in 12 Exonen organisiert. Für *Xenopus laevis* ist die genomische Sequenz-Information noch unvollständig, aber aufgrund der konservierten Sequenzen an den Exon/Intron-Grenzen wird eine entsprechende genomische Organisation auch für *P7* des Frosches angenommen. Alle Exon/Intron Grenzen entsprechen der „gt-ag“ Regel, d.h. jedes Intron beginnt mit „gt“ und endet mit „ag“. Das *P7* Ortholog der Ratte ist auf Chromosom 19q11 lokalisiert.

5.1.3 Alternatives Spleißen der P7-Transkripte

Eine Besonderheit der *P7*-Genexpression scheint ein alternatives Spleißen der mRNA-Transkripte zu sein. Bei der Klonierung des *P7* von Mensch und Maus wurden drei verschiedene Transkriptionsvarianten nachgewiesen und kloniert (Transkriptionsvarianten 1 bis 3 bei Mensch und Maus; **Abb. 13** und **14**). Diese Spleiß-Varianten sind zum Teil *in frame*, d.h. das normale Ablesen des offenen Leserahmes wird nicht gestört (Variante 1 bei Mensch sowie Varianten 1 und 3 bei Maus) zum Teil aber auch nicht *in frame* und führen so zu einem vorzeitigen Abbruch der Protein-Synthese (Varianten 2 und 3 des Menschen sowie Variante 2 der Maus).

Transkriptionsvariante 1 bei Mensch und Maus entspricht der vollen Länge des Leserahmes und codiert für ein Protein von 340 Aminosäuren (*P7* Isoform a). Durch Überspringen der Exone 8 und 9 (*exon skipping*) des humanen *P7*-Gens wird die Variante 2 gebildet. Die Klonierung der *P7*-X-Bande ermöglichte die Identifizierung der dritten humanen *P7*-Variante. Obwohl bei Mensch, Ratte und Maus eine Gen-Struktur von 12 Exonen bestätigt wurde, wird bei der Transkriptionsvariante 3

des humanen P7 ein zusätzliches Exon aus dem 11. Intron prozessiert, welches als Exon 11' bezeichnet wurde. Dieses Exon ist 110 bp lang und befindet sich 350 bp vor dem Anfang des 12.

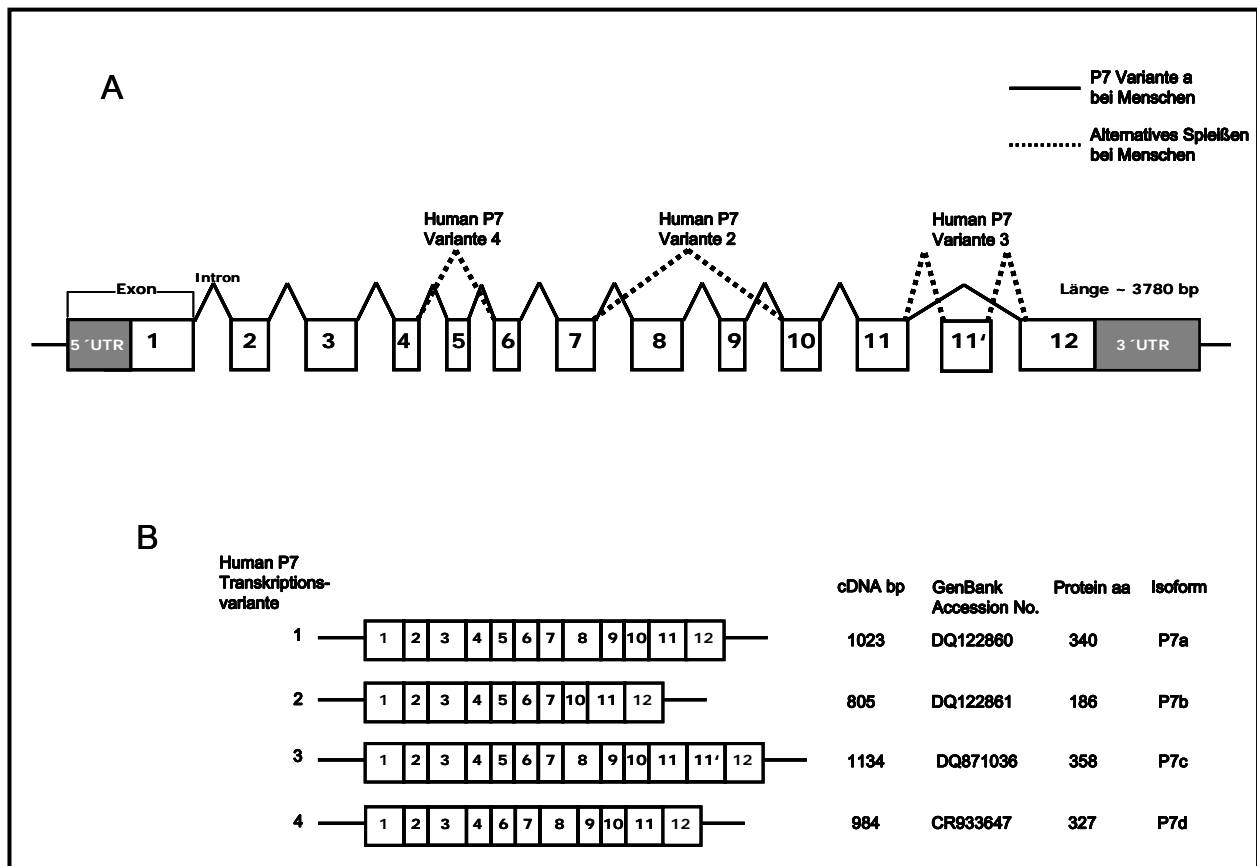


Abb. 13. A) Genomische Organisation und alternatives Spleißen des humanen *P7*-Gens. Exone sind in Form von Boxen dargestellt. Nicht-translatierte Bereiche sind schattiert. Die kontinuierliche Linie repräsentiert das Spleißen von *P7* Transkriptionsvariante 1. Alternatives Spleißen ist in gestrichelten Linien dargestellt. B) Prozessierte mRNA-Transkripte. Durch das alternative Spleißen werden die Varianten 2 und 3 gebildet. In der GenBank ist eine weitere Transkriptionsvariante zu finden, die hier Variante 4 genannt wurde. Die cDNA- und Protein-Länge sowie die GenBank-Accession Numbers sind für alle Varianten angegeben.

Exons (siehe **Abb. 13**). Beide humanen Spleiß-Varianten, *P7* Varianten 2 und 3, führen zu einem vorzeitigen Abbruch der Protein-Synthese an Aminosäurenposition 187 bzw. 359 und somit zu trunkierten Protein-Isoformen (*P7* Isoformen b und c).

Bei der Maus *P7* Variante 2 werden die Exone 2 und 10 übersprungen, was in einem vorzeitigen Stop-Codon an Aminosäurenposition 104 resultiert. Maus *P7* Variante 3 ist in Exon 7 geskippt und liegt *in frame*. Das daraus resultierende Protein besteht aus 312 Aminosäuren. Die klonierten Transkriptionsvarianten 2 und 3 von Mensch und Maus wurden ebenfalls in die GenBank Sequenz-Datenbank eingetragen. Die folgenden Zugangsnummern wurden vergeben: DQ122861 (Human *P7* Variante 2), DQ871036 (Human *P7* Variante 3), AY825927 (Maus *P7* Variante 2) und AY825928 (Maus *P7* Variante 3). Die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente wurden alle mit den Varianten 1 von Mensch und Maus durchgeführt.

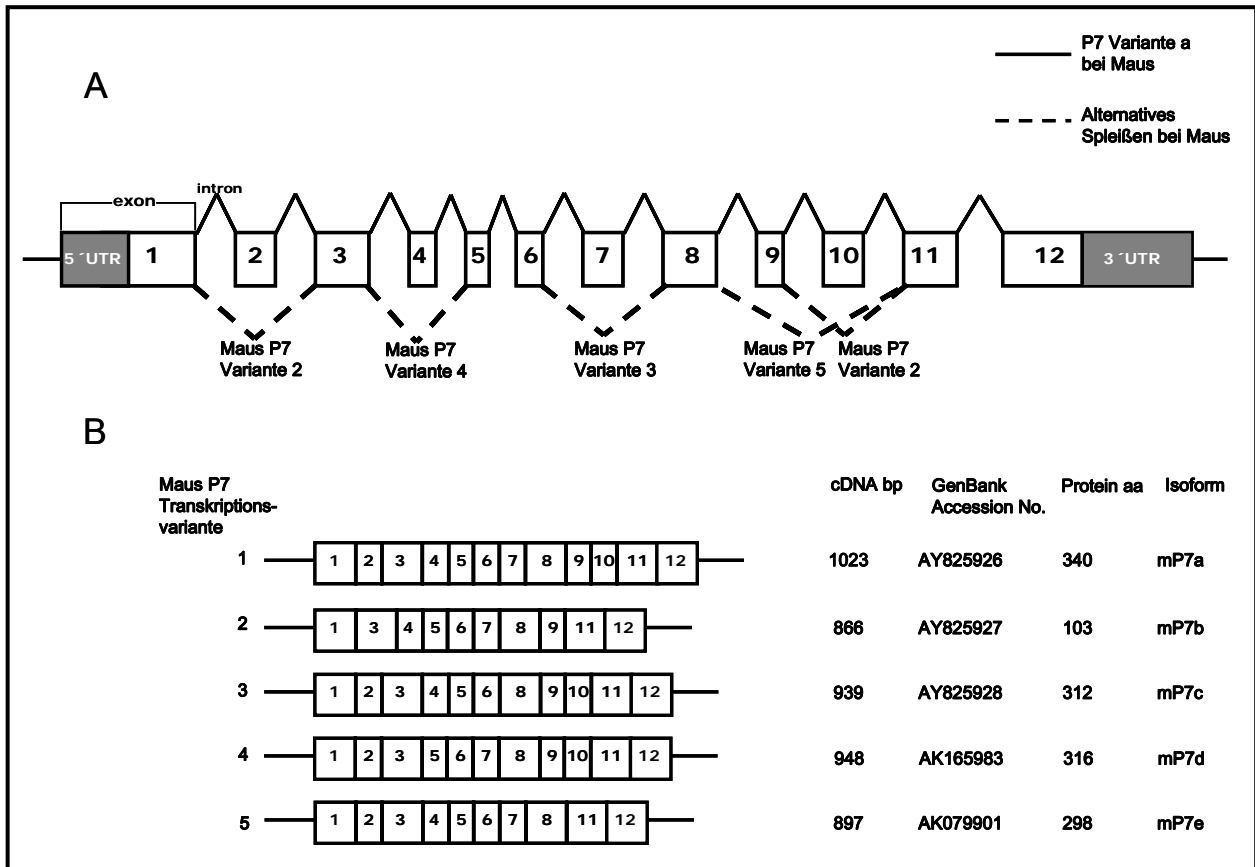


Abb. 14. A) Genomische Organisation und alternatives Spleißen des *P7*-Gens der Maus. B) Prozessierte mRNA-Transkripte des Maus *P7*-Gens. Durch alternatives Spleißen werden die Varianten 2 und 3 gebildet. In der GenBank Sequenz-Datenbank sind zwei weitere Transkriptionsvarianten zu finden, die hier Variante 4 und 5 genannt wurden. Für weitere Erklärungen siehe **Abb. 13**.

5.1.4 Im Genom von *Xenopus laevis* existieren zwei *P7*-Gene

Im Gegensatz zu den Säugetierspezies, Mensch, Ratte und Maus, in denen nur ein einziges *P7*-Gen vorkommt, wurden bei *X. laevis* zwei verschiedene mRNA-Transkripte (xP7.1 und xP7.2) gefunden. Dies wurde mit verschiedenen Klonierungsexperimenten bestätigt. Da das zur Klonierung eingesetzte Gewebe aus demselben Tier entnommen wurde, wird angenommen, dass im Frosch-Genom zwei verschiedene *P7*-Gene existieren. Weiterhin weisen beide Transkripte eine sehr hohe Sequenzidentität auf (> 94 % auf cDNA-Ebene). Beide Transkripte codieren für Proteine von 343 Aminosäuren. Die Ursache hierfür kann in einer Duplikation des *P7*-Gens liegen, welche entwicklungsgeschichtlich nur bei den Amphibien aufgetreten ist. xP7.2 wurde in die GenBank Sequenz-Datenbank unter der Zugangsnummer DQ148474 eingetragen. Für weitere Versuche wurde nur xP7.1 verwendet.

5.1.5 Proteinsequenz und SBF-Domäne-Architektur der P7-Proteine

Die P7-Proteine von Säugetieren und Amphibien zeigen eine außergewöhnlich hohe Homologie. Sie zeigen über 85 % Sequenzidentität auf Proteinebene (**Tab. 6**). Human P7 ist mit 94,4 % und 94,7 % identisch zu den Orthologen von Ratte bzw. Maus. Die am nächsten verwandten P7-Proteine sind die von Ratte und Maus (97,6 % Identität). Frosch P7 zeigt zu dem menschlichen Protein 87,1 % Sequenzidentität.

Tab. 6. Vergleich der Proteinsequenzen von P7 des Menschen (h), der Ratte (r), der Maus (m) und des Frosches (x). Die Berechnung der Sequenzidentität (in %) beruht auf einem Alignment mit Hilfe des Programmes DNASTAR 3.1.7.

	hP7	rP7	mP7	xP7
hP7	100,0	94,4	94,7	87,1
rP7		100,0	97,6	85,6
mP7			100,0	85,3
xP7				100,0

Alle P7-Proteine enthalten die SBF-Domäne, welche auch in den Proteinen der SLC10- und ACR3-Familien vorkommt (Pfam, PF01758). Diese SBF-Domäne erstreckt sich von Aminosäuren 44 bis 225 (**Abb. 15**). Bei keinem der P7-Proteine konnte eine mögliche Glykosilierungsstelle in der Aminosäuresequenz identifiziert werden (NetNGlyc 1.0, Blom et al. 2004; NetOGlyc 3.1, Julenius et al. 2005).

Die Transmembrantopologie von P7 wurde mit dem Programm TMHMM (*Hidden Markov Model Analyse*, Krogh et al. 2001) analysiert. Dieses sagt für Human P7 10 Transmembrandomänen (TMDs) vorher (**Abb. 16**). Der N-Terminus liegt dabei intrazellulär und enthält zwei negativ-geladene (E^5 und D^{10}) und vier positiv-geladene Aminosäuren (R^2 , R^6 , R^8 und K^9). Die folgenden 9 extrazellulären und intrazellulären Loops bestehen aus 5 bis 13 Aminosäuren und enthalten ca. 82 % der gesamten geladenen Aminosäuren des Proteins. Ein positiv-geladener Cluster ($^{88}RRYIKDWLERKK^{99}$) ist im dritten intrazellulären Loop zu finden. Der 12-Aminosäuren lange C-Terminus liegt nach dieser Programmberechnung nach innen orientiert und enthält 4 positiv-geladene Aminosäuren (R^{329} , K^{331} , K^{334} und R^{337}).

Eine Phosphorylierungsstelle wurde von dem Programm NetPhos 2.0 (Blom et al. 1999) für alle P7-Proteine an Position 276 gefunden. Dieser Threonin-Rest ist aber nicht intrazellulär, sondern in der 9. TMD lokalisiert und kann daher vermutlich nicht phosphoryliert werden.

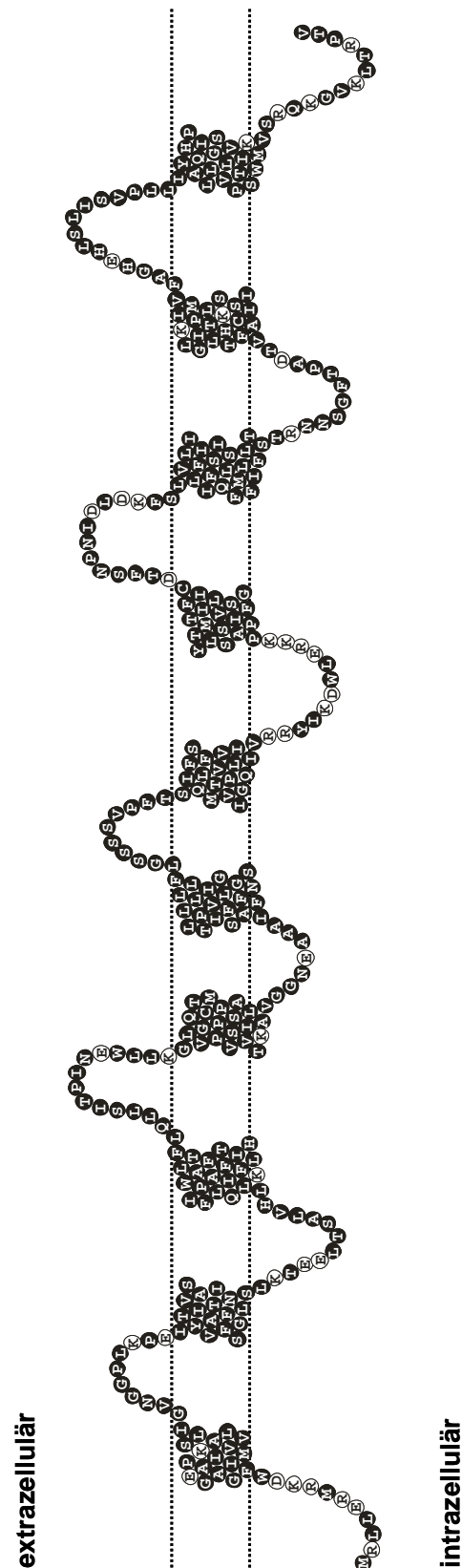


Abb. 16. Transmembrandomänen-Modell des humanen P7 nach Berechnung des Programms TMHMM. N- und C-Terminus liegen intrazellulär. Geladene Aminosäuren (K, R, D, und E) sind in weißen Kreisen mit schwarzen Buchstaben dargestellt.

5.1.6 Membrantopologie der P7-Isoformen

Das Programm TMHMM sagte auch für Ratte, Maus und Frosch P7 eine 10-TMD-Membrantopologie voraus. Die durch alternatives Spleißen der *P7*-Gene gebildeten P7-Isoformen weichen jedoch von dieser Topologie ab. Bei den Isoformen b von Mensch und Maus handelt es sich stets um verkürzte Proteine. Die Isoform c des Menschen ist dagegen länger und enthält einen längeren C-Terminus.

Interessanterweise verliert P7 Isoform c der Maus, die einzige vollständig translatierte Isoform, den dritten extrazellulären Loop und die sechste TMD. Weiterhin sind die 4. TMD und der 2. intrazelluläre Loop nicht mehr vorhanden und sind in dem langen 2. extrazellulären Loop von 43 Aminosäuren enthalten (**Abb. 17**).

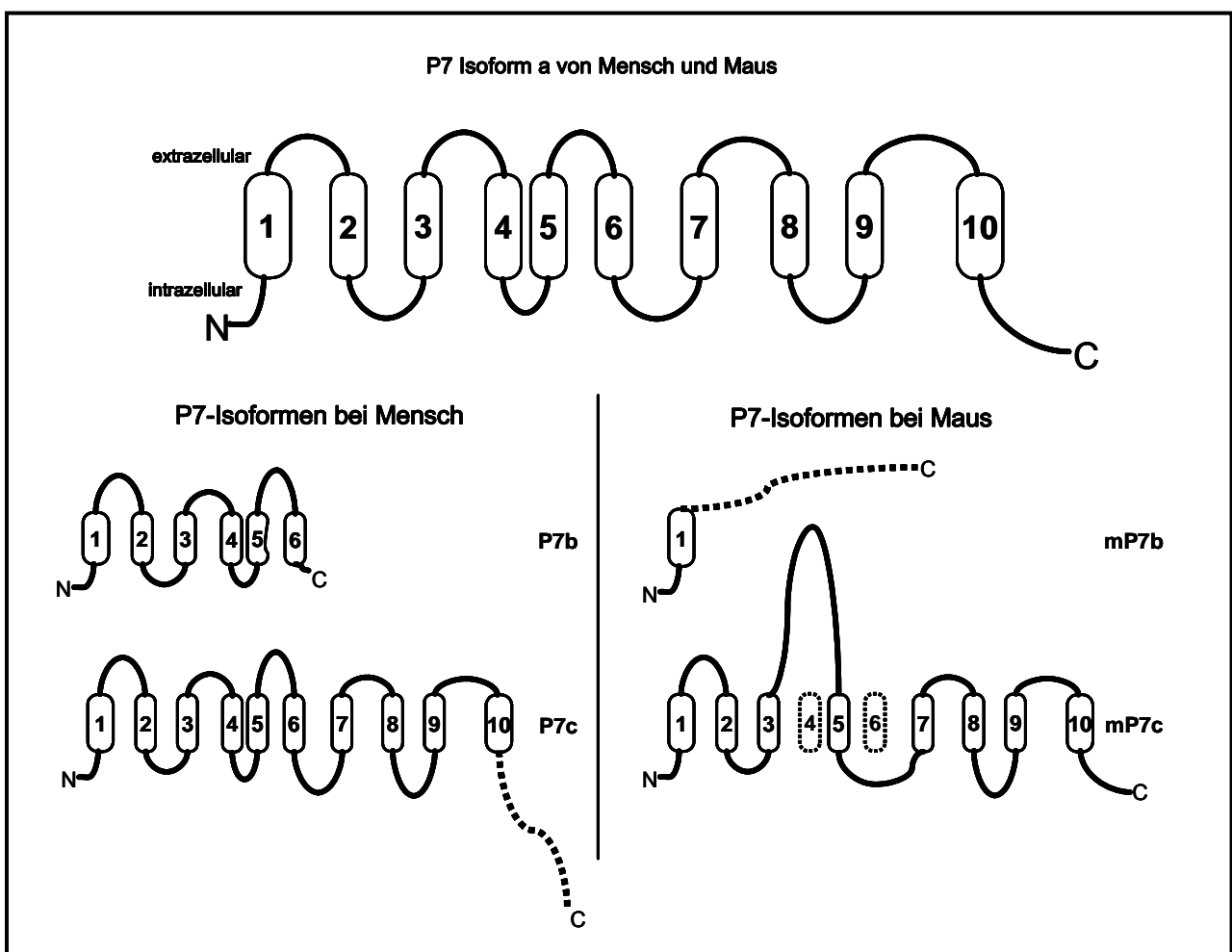


Abb. 17. P7-Isoformen bei Mensch und Maus. P7-Isoform a bildet 10-TMDs. Die Translation der Isoformen Human P7 b und c sowie Maus P7 b wird vorzeitig abgebrochen und führt entweder zu einem verkürzten Protein (Maus und Mensch P7b) oder zu einem Protein mit unterschiedlicher Aminosäuresequenz (gestrichelte Linie Maus P7b und Human P7c). Die Isoform c der Maus (mP7c) wird vollständig translatiert, das Protein verliert aber die sechste TMD und den dritten extrazellulären Loop.

5.2 Gewebe-Expression von P7

Die Expression der *P7*-Gene wurde durch RT-PCR und Northern Blot untersucht. RT-PCR wurde aus verschiedenen Organen von Mensch, Ratte, Maus und *Xenopus* durchgeführt (**Abb. 18**). Bei Ratte und Maus wurde P7 in allen Geweben, außer der Skelettmuskulatur, nachgewiesen. Die Expression war besonders stark in Herz, Gehirn, Dickdarm, Dünndarm, Lunge, Niere, Leber und Nebenniere. Frosch P7 hat eine starke Expression in Dünndarm und Milz gezeigt. Bei Menschen scheint P7 ebenfalls sehr breit exprimiert zu sein. Eine P7-Expression wurde in allen getesteten Geweben detektiert. Hier wurden gezielt Primer verwendet, welche P7 Variante 1 und 3 nach ihren Fragmentgrößen unterscheiden konnten. Dabei zeigen beide, Variante 1 und 3, eine gleiche starke Expression in Herz, Gehirn, Leber, Niere und Plazenta.

Mit PolyA⁺RNA aus Gehirn, Herz, Leber, Lunge, Muskel und Milz der Ratte wurde die Expression von P7 der Ratte auch durch eine Northern Blot Hybridisierung nachgewiesen. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der RT-PCR wurde hier lediglich eine einzige Bande, nämlich im Gehirn, nachgewiesen (**Abb. 19**). Die Bande liegt bei 3,5 kb und das entspricht in etwa der berechneten P7-mRNA-Länge. Der Unterschied zwischen den Ergebnissen beider Methoden liegt vermutlich in einer Detektion verschiedener Transkriptionsvarianten durch die eingesetzten PCR-Primer und die für den Northern Blot verwendete P7 cDNA-Sonde.

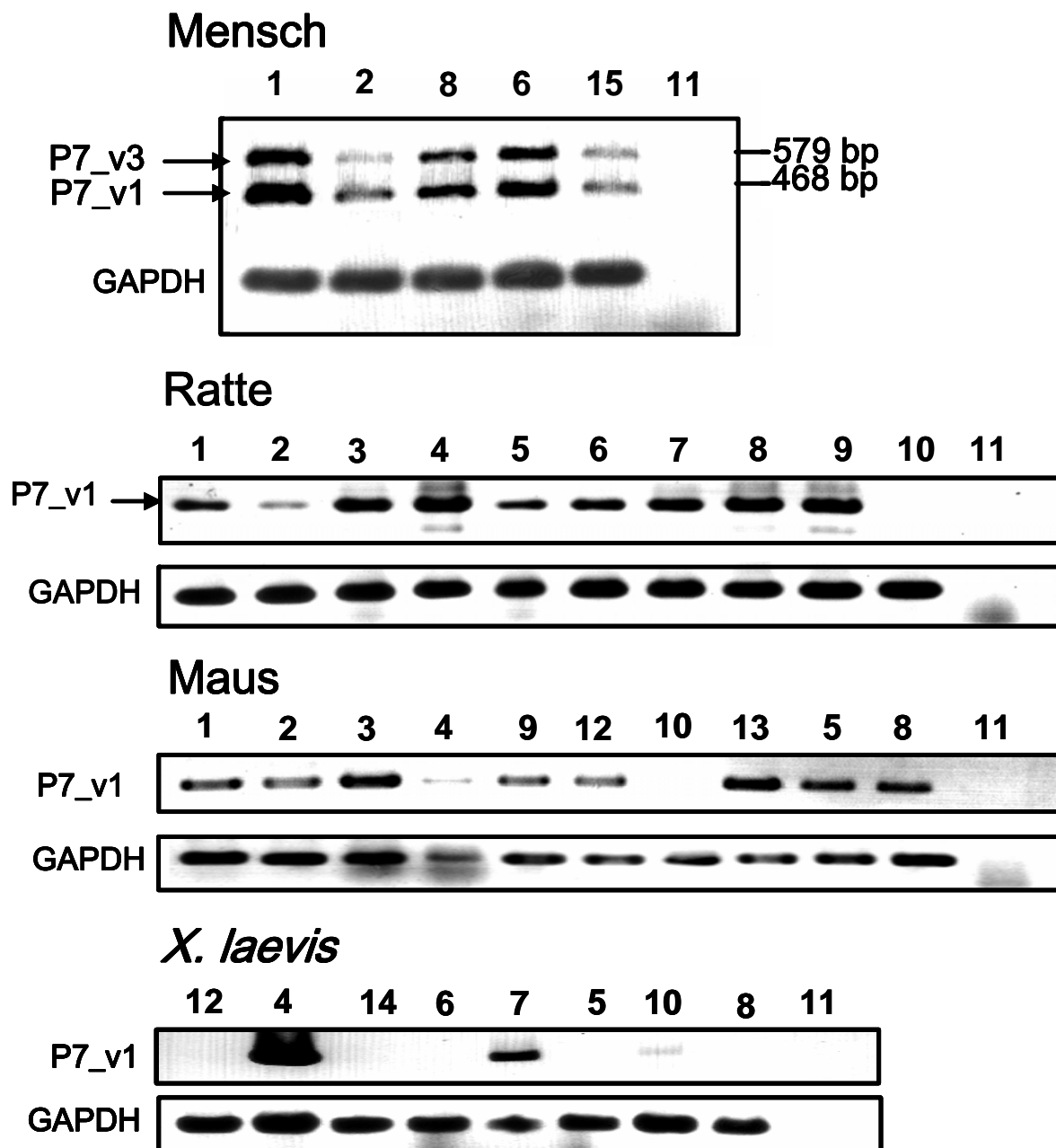


Abb. 18. RT-PCR-Expressionsprofile der *P7*-Gene in verschiedenen Organen von Mensch, Ratte, Maus und Frosch. Die folgenden Gewebe wurden analysiert: 1: Herz; 2: Gehirn; 3: Dickdarm; 4: Dünndarm; 5: Lunge; 6: Niere; 7: Milz; 8: Leber; 9: Nebenniere; 10: Muskel; 11: Kontrolle; 12: Magen; 13: Ovar; 14: Oozyten; 15: Plazenta. Als positive Kontrolle wurde die Expression von GAPDH in jedem Gewebe nachgewiesen. Wasser (11) statt cDNA wurde als PCR-Kontrolle benutzt. P7_v1 wird in allen Spezies sehr breit exprimiert. P7_v3 von Mensch zeigt die gleiche Expression wie P7_v1.

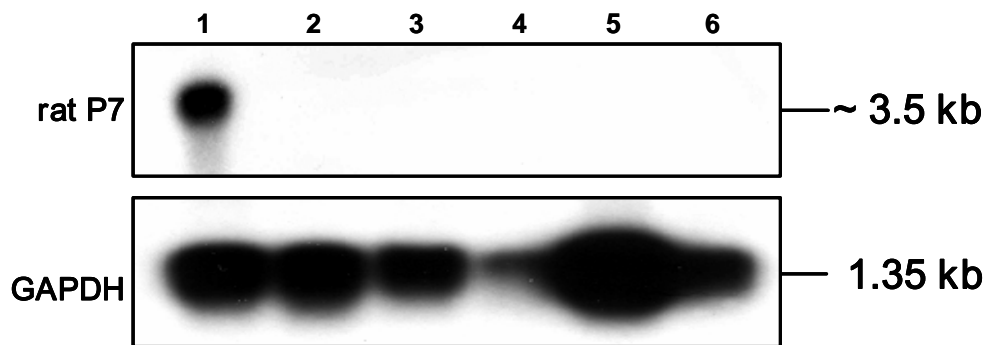


Abb. 19. Northern Blot Analyse des P7-Gens der Ratte. Die folgenden Gewebe wurden analysiert: 1: Gehirn; 2: Herz; 3: Leber; 4: Lunge; 5: Muskel; 6: Milz. Die Expression von GAPDH wurde in jedem Gewebe nachgewiesen.

5.3 Heterologe Expression von P7 in *Xenopus laevis*-Oozyten

Aufgrund einer gewissen Sequenzhomologie zu den Gallensäuretransportern NTCP und ASBT wird P7 in der GenBank Sequenz-Datenbank als potentieller Gallensäuretransporter geführt. Zur Untersuchung der Transportfunktion wurden die klonierten P7-Sequenzen in *Xenopus laevis*-Oozyten exprimiert. In den Transportsmessungen wurde jeweils eine passende Positiv-Kontrolle benutzt: NTCP für die Transportsmessungen mit Gallensäuren, Oatp1a4 für Digoxin und SOAT für Steroidsulfate. Als Negativ-Kontrolle wurden Wasser-injizierte Oozyten verwendet. Weiterhin wurden andere Substanzen wie Prostaglandin E₂ und Leukotrien C₄, die keine SLC10-Substrate sind, getestet. **Tabelle 7** zeigt eine Liste der getesteten radioaktiv markierten Substanzen und die dazugehörigen Messergebnisse. Zu den getesteten Substanzen gehören Gallensäuren (Taurocholat, Cholat und Chenodeoxycholat), Steroidsulfate (Estron-3-sulfat, Dehydroepiandrosteronsulfat und Pregnenolonsulfat), Eicosanoide (Prostaglandin E₂ und Leukotrien C₄), das Herzglykosid Digoxin und Estron-17 β -Glucuronid. NTCP, SOAT und Oatp1a4 zeigten wie erwartet eine Transportaktivität für die entsprechenden Substrate. Für die P7-Proteine konnte allerdings keine Transportaktivität für die getesteten Substanzen nachgewiesen werden. Damit hat P7 keine der Transportfunktionen, die für die SLC10-Carrier NTCP, ASBT und SOAT bekannt sind.

Tab. 7. Testmessungen mit den P7-Proteinen von Mensch, Maus und Ratte. *Xenopus laevis*-Oozyten wurden mit jeweils 46 nl (4,6 ng) cRNA bzw. 46 nl Wasser injiziert. Nach drei Tagen in Kultur wurde die Aufnahme der gezeigten Substanzen in den angegebenen Konzentrationen für 60 min bei 25°C gemessen. Die Werte entsprechen fmol/Oozyte/60 min und sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben (n = 10-15). Zur Errechnung der Ratio wurden die Messwerte der cRNA-injizierten Oozyten durch die der Wasser-injizierten Oozyten dividiert. Ab einer Ratio von 4 ist ein spezifischer Substrattransport anzunehmen.

Substanz / [Konzentration]	NTCP		Human P7		Ratte P7	
	Aufnahme	Ratio	Aufnahme	Ratio	Aufnahme	Ratio
Taurocholat [6,4 μM]	11470 \pm 7526	468*	43 \pm 24	1.7		
Cholat [5 μM]	13132 \pm 6612	75*	159 \pm 48	0.9		
Chenodeoxycholat [5 μM]	17491 \pm 5604	2.9*	5083 \pm 1881	0.8		
Estron-3-sulfat [100 nM]	134,3 \pm 59,4	50*	5,3 \pm 1.7	1.9		
DHEAS [2 μM]	3060,5 \pm 1454,0	13*	253.3 \pm 84.5	1.0		
PREGS [100 nM]	277,0 \pm 140,5	15*	29,1 \pm 5.3	1.6		
Taurocholat [5 μM]	1009 \pm 39	132*			8.7 \pm 2.2	1.14
PGE₂ [3,7 nM]	0.455 \pm 0.16	1.3			0.35 \pm 0.1	0.9
LTC₄ [1 nM]	0.33 \pm 0.08	1.2			0.25 \pm 0.05	0.9
Ouabain [1,3 nM]	1.48 \pm 0.2	1.4			1.13 \pm 0.4	1.07
Substanz / [Konzentration]	SOAT		Oatp1a4		Maus P7	
	Aufnahme	Ratio	Aufnahme	Ratio	Aufnahme	Ratio
Estron-3-sulfat [0,5 μM]	450,6 \pm 197,8	34.6*			25.9 \pm 15.2	2
DHEAS [0,5 μM]	522,3 \pm 240,8	13.3*			56.7 \pm 18.3	1.4
Taurocholat [5 μM]			225.5 \pm 90.7	13*	17.97 \pm 2.8	1.0
Ouabain [1 μM]			206 \pm 105.8	69.6*	2.83 \pm 0.5	1.0
Estron-3-sulfat [0,5 μM]			89.4 \pm 22.6	4.5*	27.3 \pm 11.1	1.4
LTC₄ [2.6 nM]					0.4 \pm 0.1	0.9
Estron-17β-Glucuronid [20 μM]					2328 \pm 1079	1.0

* $p < 0.001$: signifikant im Vergleich zu Wasser-injizierten-Oozyten nach One-way ANOVA und Bonferroni *post hoc* Analyse. DHEAS: Dehydroepiandrosteronsulfat; PGE₂: Prostaglandin E₂; LTC₄: Leukotriene C₄; PREGS: Pregnenolonsulfat.

5.4 Expression und Lokalisation von P7 in *Xenopus laevis*-Oozyten

Um zu untersuchen, ob das Fehlen einer Transportfunktion in einer gestörten Proteinexpression in den Oozyten begründet liegt, wurde ein FLAG-Motiv am C-Terminus aller P7-Proteine eingeführt. Nach Injektion der entsprechenden cRNA-Moleküle in *Xenopus laevis*-Oozyten konnte die Expression der FLAG-markierten Proteine über Immunfluoreszenz nachgewiesen werden. Wie in **Abbildung 20** zu sehen ist, wurden Human und Maus P7 in der Zellmembran der Oozyten detektiert. Bei *Xenopus* P7 wurde ebenfalls ein starkes Fluoreszenz-Signal detektiert. Es scheint aber, dass das Protein in diesem Fall in einem submembranären Kompartiment stecken geblieben ist. Kein deutliches Fluoreszenz-Signal konnte für Ratte P7 detektiert werden.

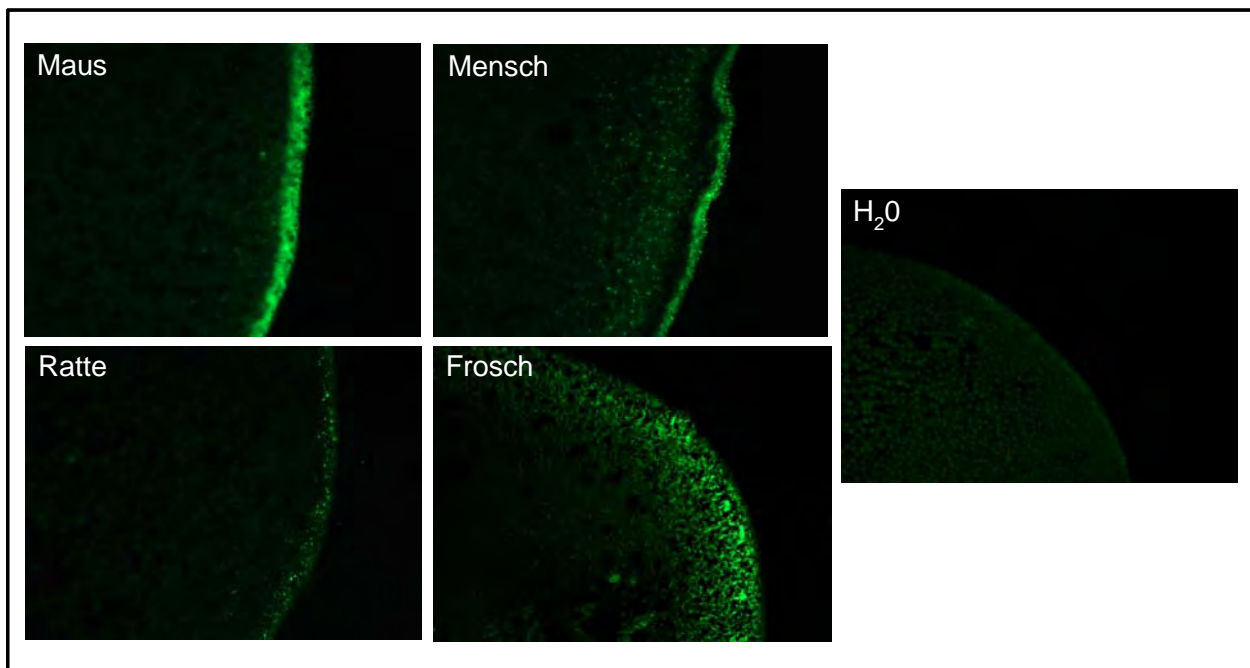


Abb. 20. Nachweis der Expression der P7 Proteine mittels FLAG-Tag in *X. laevis*-Oozyten. Das FLAG-Epitop wurde von dem monoklonalen Antikörper anti-FLAG M2 erkannt und später mit Alexa Fluor 488 goat anti-Maus durch Immunfluoreszenz detektiert. Wasser-injizierte Oozyten wurden als Negativ-Kontrolle verwendet. Man sieht eine Protein-assoziierte Fluoreszenz von Maus und Mensch P7 in der Zellmembran. (Vergrößerung: 20x).

Mit Hilfe des Programms PSORT II (Nakai und Horton 1999) wurde für alle P7-Proteine eine wahrscheinliche zelluläre Lokalisation berechnet. Interessanterweise stimmen die Beobachtungen in den Oozyten mit der Berechnung von PSORT II überein. Für Maus und Human P7 wurde eine Plasmamembranlokalisierung vorausgesagt, während die Expression von Ratte P7 nur mit 33% Wahrscheinlichkeit in der Plasmamembran vorausgesagt wurde (**Tab. 8**).

Tab. 8. Vorhergesagte zelluläre Lokalisation (in % Wahrscheinlichkeit) der P7-Proteine nach der Berechnung von PSORT II.

Vorhersage	hP7	mP7	xP7	rP7	rP7 _(L302V)
Plasmamembran	60,9%	69,6%	69,6%	33,3%	69,6%
endoplasmatisches Retikulum	34,8%	26,1%	21,7%	55,6%	26,1%
Mitochondrien	4,3%	4,3%	4,3%	11,1%	4,3%

Da die vier Proteine sehr ähnlich sind, lag die Vermutung nahe, dass bei Ratte P7 bestimmte Sequenzmotive existieren, welche von PSORT II als Retentionssignal für das endoplasmatische Retikulum erkannt wurden. Da Maus und Ratte P7-Proteine sehr ähnlich sind und bei Maus eine

Membranlokalisation vorausgesagt wurde, wurden die 8 unterschiedlichen Aminosäuren in Ratte P7 *in silico* durch die der Maus ersetzt und über PSORT II das Proteinsorting erneut analysiert. Interessanterweise bewirkt der Austausch von Leucin zu Valin an Position 302 von Ratte P7 (**Tab. 8, Abb. 21**), dass nun auch für Ratte P7 (L302V) eine Plasmamembranlokalisation vorausgesagt wird. Dies lässt darauf schließen, dass L302 in der *in silico* Berechnung für die Protein-Retention im endoplasmatischen Retikulum verantwortlich ist.

L302V
↓

mP7	301	SVPLLIYHP
rP7	301	SLPLLIYHP
P7	301	SVPLLIYHP
xP7	301	SVPLLIYHP

Abb. 21. Position der eingeführten *in silico* Mutation in Ratte P7.

5.5 Expression und Lokalisation von Mensch und Ratte P7 in HEK293-Zellen

In Ergänzung zu den FLAG-Studien in *Xenopus laevis*-Oozyten wurde auch die Expression der P7-Proteine in Säugetierzellen untersucht. Dafür wurden die P7-FLAG-Konstrukte von Ratte und Mensch in den Vektor pcDNA5/TO subkloniert und in HEK293-Zellen (*Human Embryonic Kidney Cells*) transfiziert. Eine anschließende Immunfluoreszenz zur Detektion der FLAG-markierten Proteine wurde sowohl in permeabilisierten als auch in nicht permeabilisierten Zellen durchgeführt. Das FLAG-Epitop konnte bei Mensch und Ratte nur in den permeabilisierten Zellen detektiert werden (**Abb. 22**). Dies spricht für eine intrazelluläre Lokalisation des C-Terminus und bestätigt das in **Abbildung 16** vorgestellte berechnete 10-TMD-Modell.

Während bei Human P7 eindeutig nur ein Membran-assoziiertes Signal erhalten wurde, konnte bei Ratte P7 ein anderes Expressionsmuster beobachtet werden. In manchen Zellen wurde eine punktförmig kompartimentale Expression beobachtet, welche nicht der Plasmamembran zuzuordnen war (**Abb. 23**). Colokalisationsstudien mit dem Marker-Protein für das endoplasmatische Retikulum Calnexin sollten dabei klären, ob Ratte P7 in der Membran des endoplasmatischen Retikulums exprimiert wird. Obwohl im endoplasmatischen Retikulum eine Colokalisation von Ratte P7 und Calnexin zu sehen war (**Abb. 24**), wurden die P7-Proteine zusätzlich in der Plasmamembran nachgewiesen. Mit einer dreidimensionalen Rekonstruktion wurde dies bestätigt (**Abb. 25**).

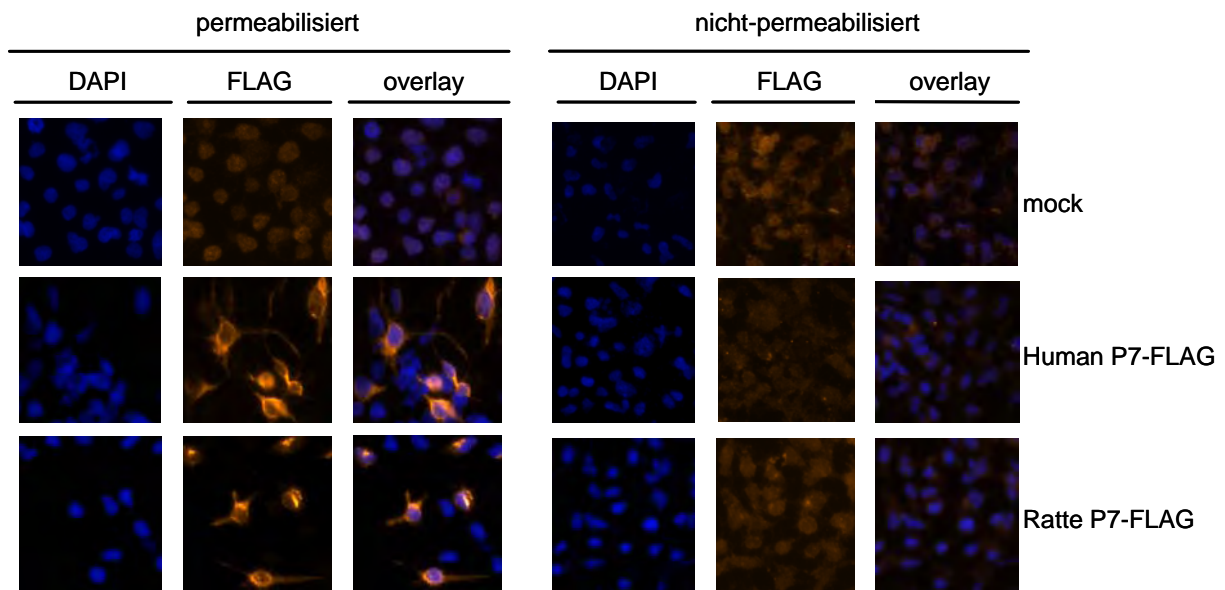


Abb. 22. Expression von Human und Ratte P7 in HEK293-Zellen. P7-FLAG-Konstrukte wurden in HEK293-Zellen transfiziert und die Anti-FLAG Immunfluoreszenz wurde in permeabilisierten und nicht-permeabilisierten Zellen untersucht. Der Anti-FLAG-Antikörper wurde mit einem Cy3-konjugierten sekundären Antikörper detektiert (orange). Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Als Kontrolle dienten Zellen, welche mit einem leeren Plasmid transfiziert wurden (mock). Die Bilder zeigen eindeutig, dass der FLAG-Antikörper nur in permeabilisierten Zellen an das FLAG-Motiv binden kann. (Vergrößerung: 20x).

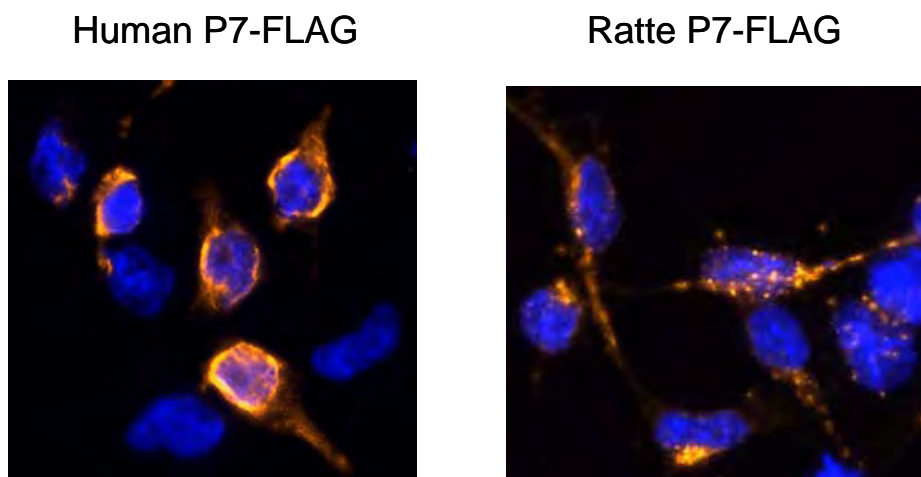


Abb. 23. Expression von Human und Ratte P7 in HEK293-Zellen. Auffällig ist die punktartige Expression von Ratte P7 im Zytoplasma der Zellen. (Vergrößerung: 40x).

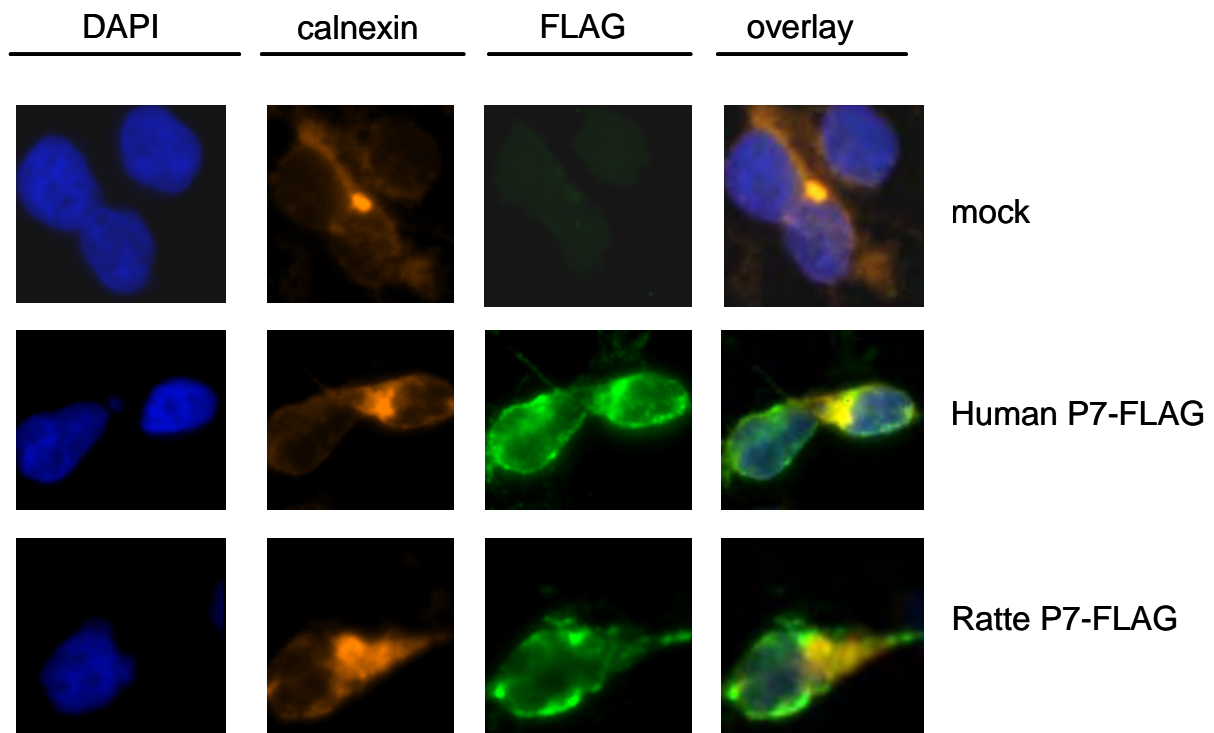


Abb. 24. Colokalisation von Human und Ratte P7 mit dem ER-Marker Calnexin. FLAG-P7-Proteine wurden mit Alexa Fluor 488 nachgewiesen (grün); Calnexin mit Cy3 (orange). Durch Überlagerung des orangen und grünen Kanals (overlay) wird die Colokalisation im ER sichtbar gemacht (gelb). (Vergrößerung: 40x).

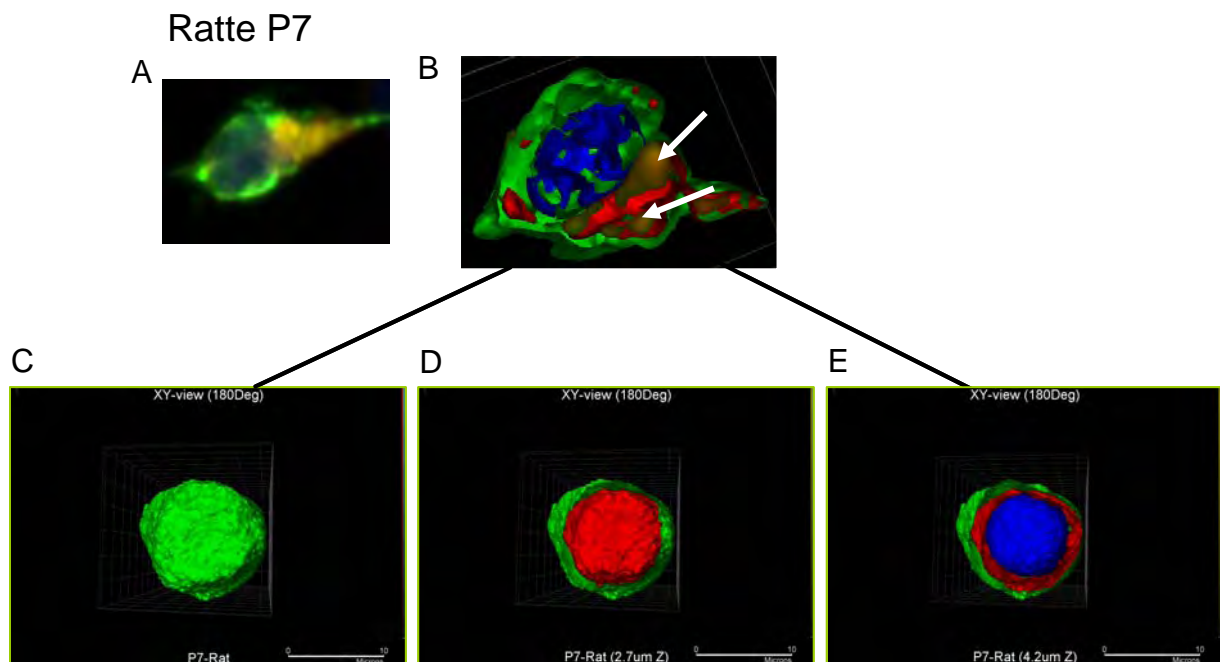


Abb. 25. Dreidimensionales Bild von Ratte P7. A: ausgewählte Zelle, aus der das 3D-Bild erstellt wurde. (Vergrößerung: 40x). B: 3-D-Bild. Die überlappenden Regionen im ER sind mit Pfeilen gekennzeichnet. C, D, E: 3-D-Ansicht der Zelle in verschiedenen Schichten. Grün: FLAG (Ratte-P7), rot: Calnexin (ER), blau DAPI (Zellkern). Neben einer ER-assoziierten Färbung tritt die FLAG-assoziierte Fluoreszenz auch in der Plasmamembran auf.

5.6 P7: Membrantopologie

Mit sechs verschiedenen Programmen wurde *in silico* die Membrantopologie der P7 Proteine analysiert. HMMTOP, TopPred2, und TMHMM sagten für Human P7 eine Membrantopologie von 10 TMDs mit einem intrazellulären N- und C-Terminus voraus. Im Gegensatz dazu, wurde von den Programmen ConPred II, Tmpred und SOSUI ein Modell von 9 TMDs mit einem intrazellulären N-Terminus aber mit einem extrazellulär lokalisierten C-Terminus favorisiert (**Tab. 9**).

Tab. 9. Vergleich der Transmembrantopologie des humanen P7 nach Voraussage verschiedener Computerprogramme. Die Orientierung des N- (N_T) und C-Terminus (C_T) ist gezeigt.

Programm	N _T	TMD1	TMD2	TMD3	TMD4	TMD5	TMD6	TMD7	TMD8	TMD9	TMD10	C _T
HMMTOP	in	12-31	40-58	75-98	107-125	140-159	168-187	200-219	232-255	268-290	299-322	in
ConPred II	in	10-30	39-59	74-94	105-125	139-159	167-187	201-221	233-253	-	298-318	out
TopPred2	in	10-30	40-60	74-94	107-127	140-160	164-184	200-220	234-254	267-287	299-319	in
TMpred	in	11-30	40-58	75-95	-	140-158	164-187	200-219	236-254	269-294	299-319	out
SOSUI	in	10-32	38-59	69-91	103-125	138-160	166-187	202-224	232-254	-	298-320	out
TMHMM	in	12-30	40-57	70-92	107-129	136-158	168-187	200-219	234-256	269-291	306-328	in

Das Programm Tmpred konnte die 4. TMD nicht erkennen. Die einzige Diskrepanz zwischen den übrigen 5 Programmen bezieht sich auf die 9. TMD des 10-TMD-Modells. Die Programme ConPred II und SOSUI konnten die 9. TMD nicht als TMD erkennen und ließen diese in den 4. intrazellulären Loop einfließen; damit ist der C-Terminus extrazellulär lokalisiert. Um die TMD-Topologie und die Orientierung des N- und C-Terminus der P7 Proteine experimentell zu überprüfen, wurde zusätzlich zu dem FLAG-Tag ein weiteres Motiv in Ratte und Human P7 strategisch eingeführt. Dabei handelte es sich um das sog. HA-Tag, welches für das Epitop des Hämagglutinins des Influenza-Virus codiert. Durch Ziel-gerichtete Mutagenese wurde in Ratte und Human P7 das HA-Tag (hier HA2 genannt) nach der Aminosäureposition 293 einmutiert. Dem 10-TMD-Modell folgend, wäre dieser HA-Tag in dem 5. extrazellulären Loop, also extrazellulär, lokalisiert. Die Expression der doppelt-markierten P7-FLAG-HA2 Proteine wurde sowohl in permeabilisierten als auch in nicht permeabilisierten Zellen untersucht.

Das Ergebnis dieses Versuchs ist in **Abbildung 26** dargestellt. Das HA2-Epitop wurde in den permeabilisierten und nicht permeabilisierten Zellen detektiert, was dafür spricht, dass die entsprechende Sequenz extrazellulär liegt. Weiterhin beweist dieses Ergebnis, dass die P7 Proteine von Mensch und Maus in der Zellmembran lokalisiert sind. Im Gegensatz dazu konnte das FLAG-Epitop von dem Anti-FLAG-Antikörper nur in den permeabilisierten Zellen erkannt

werden. Dieses Ergebnis unterstützt klar ein Membrantopologie-Modell mit 10-TMD und einer intrazellulären Lokalisation des C-Terminus. Ein 9-TMD-Modell, wie von ConPred II, TMPred und SOSUI vorhergesagt, kann aufgrund der experimentellen Daten ausgeschlossen werden.

5.7 Bestimmung des Molekulargewichts

Die Analyse des Molekulargewichts (MW) der P7-Proteine durch Immunpräzipitation mittels des FLAG-Antikörpers ergab eine spezifische Bande bei ~27 kDa. Das sind 10 kDa weniger als das *in silico* vorhergesagte MW (37,4 kDa für Human P7 und 37,3 kDa für Ratte P7). Schwache Banden wurden bei ~54 kDa beobachtet und deuten auf größere Proteinkomplexe (eventuell P7-Dimere) hin. Um auszuschließen, dass die P7-Proteine in den HEK293-Zellen proteolytisch gespalten werden, was eine Erklärung für das niedrige MW nach Immunpräzipitation wäre, wurde ein weiteres HA-Tag (HA1 genannt) in die Sequenzen von Ratte und Human P7 eingebaut und die Expression des P7-FLAG-HA1 wiederum durch Immunfluoreszenz analysiert (**Abb. 27**). Das HA1-Epitop wurde sowohl in Ratte P7 als auch in Mensch P7 erkannt. Damit kann eine post-translationale Abspaltung des N-Terminus ausgeschlossen werden.

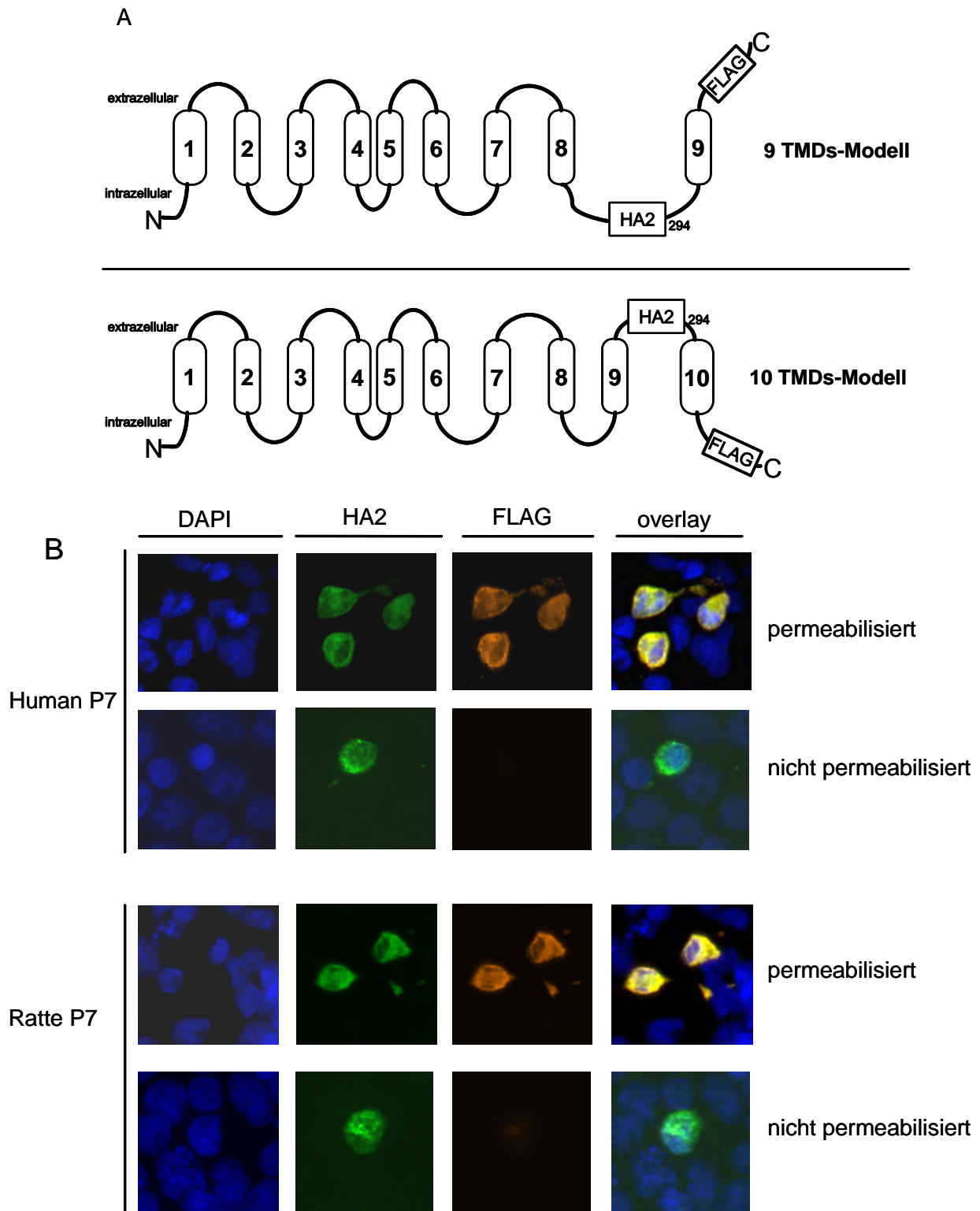


Abb. 26. Membrantopologie und Membranlokalisation von Human und Ratte P7. A) *In silico* berechnete TMD-Modelle für P7. Transmembrandomänen sind als nummerierte abgerundete Rechtecke dargestellt. Die Positionen der eingeführten Tags (FLAG und HA2) sowie die Aminosäureposition nach dem Tag sind gezeigt. Der C-Terminus liegt in dem 9-TMD-Modell extrazellulär, während er in dem 10-TMD-Modell nach innen orientiert ist. B) Nachweis der doppelt-markierten Proteine in permeabilisierten und nicht permeabilisierten Zellen. Anti-HA- und anti-FLAG-Antikörper wurden mit Alexa Fluor 488 (grün) bzw. Cy3-konjugierten (orange) sekundären Antikörpern detektiert. Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Erläuterungen siehe Text. (Vergrößerung: 20x).

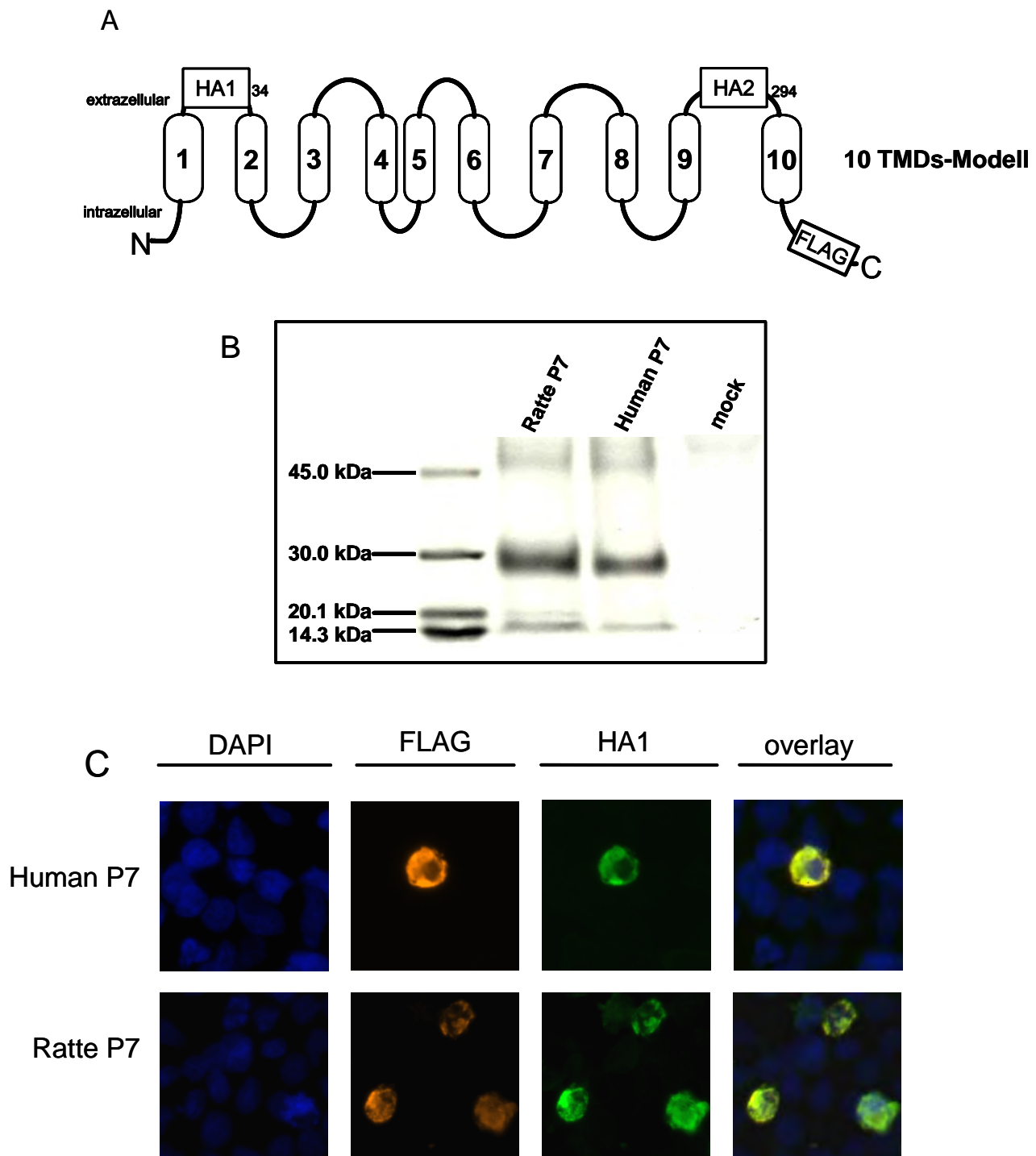


Abb. 27. A) 10-TMD-Modell von Ratte und Human P7. Die Position des HA1-Tags ist vor der Position der nachstehenden Aminosäure gezeigt. B) Immunpräzipitation von Human und Ratte P7 mit dem Anti-FLAG-Antikörper. C) Nachweis der HA1- und FLAG-markierten P7-Proteine von Mensch und Ratte. Die Expression von P7 wurde in permeabilisierten Zellen durchgeführt. Die Epitope wurden wie in **Abb. 26.B** beschrieben detektiert. Erläuterungen siehe Text. (Vergrößerung: 20x).

5.8 P7-verwandte Sequenzen: Entdeckung einer neuen Genfamilie

Aufgrund der geringen Sequenzidentität von den P7 zu den SLC10- und ACR3-Carriern (< 15 %) und den sehr hoch konservierten Proteinsequenzen innerhalb der P7 Proteine, lag die Vermutung nahe, dass es weitere P7-verwandte Proteine in anderen Spezies geben könnte. Um weitere P7-ähnliche Sequenzen zu identifizieren, wurde eine BLAST-Analyse mit den Sequenzdatenbanken von NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), EBI (*European Bioinformatics Institute*) und DDBJ (*DNA Data Bank of Japan*) durchgeführt. Als Suchanfrage wurde die SBF-Domäne von Human P7 (Nucleotid 132-678 bzw. Aminosäure 44-225) benutzt. Das Resultat war eine Liste von über 100 Sequenzen von Wirbeltieren, Pflanzen, Hefen und Bakterien, welche oft nur *in silico* identifizierte hypothetische Leserahmen darstellten. Viele dieser Sequenzen wurden im Laufe der Jahre 2005-2006 eingetragen und wurden als „similar to P7“ oder „putative sodium bile acids symporters“ bezeichnet. Mithilfe der Programme DNASTAR 3.1.7 und ClustalW (Thompson et al. 1994) wurden mit den gelisteten P7-verwandten Sequenzen Sequenzvergleiche und Identitäts-Berechnungen durchgeführt.

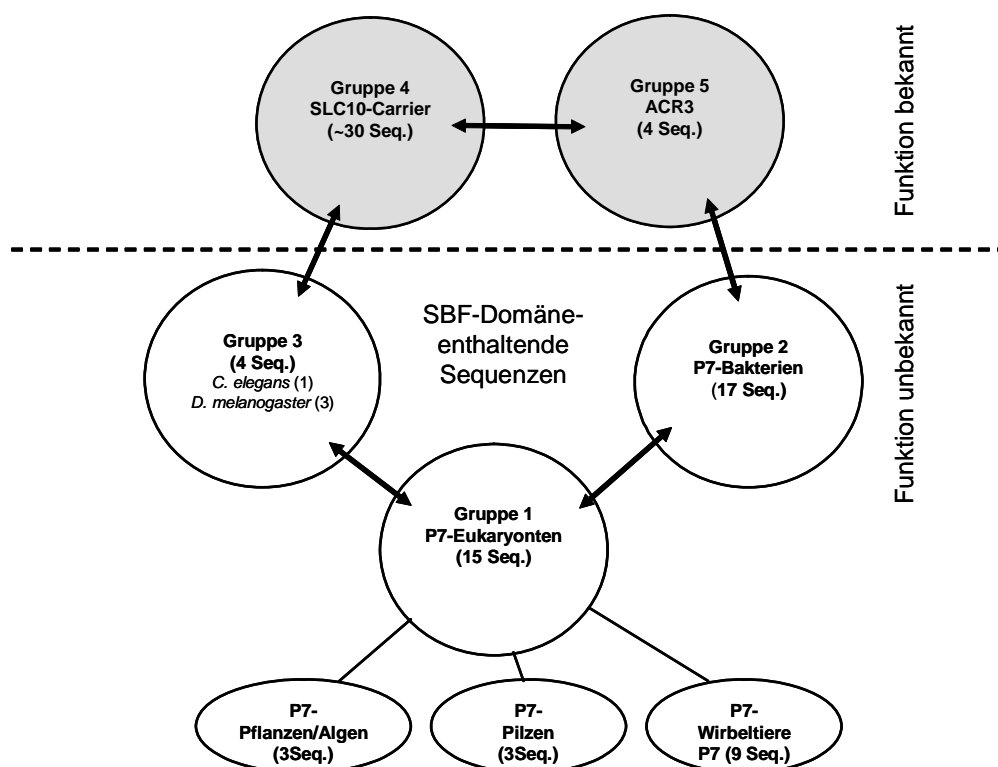


Abb. 28. Gruppen-Einteilung der P7-ähnlichen Sequenzen. In jeder Gruppe ist die Anzahl der ausgewählten Sequenzen gezeigt. Unter der gestrichelten Linie stehen jüngst eingetragene Proteine, deren Funktion noch unbekannt ist. In Gruppe 4 und 5 sind die bekannten und charakterisierten Proteine der SLC10- und ACR3-Carrier zu finden.

Alle Sequenzen, welche im Sequenzalignment geringe Übereinstimmungen mit P7 zeigten (z.B. Lücken von > 20 bp im Alignment) und geringe Sequenzidentität zu den P7 aufwiesen, wurden für die Analyse nicht betrachtet. Die verbleibenden Sequenzen wurden in 5 Gruppen eingeteilt (**Abb. 28**): Gruppe 1: Eukaryonten P7; Gruppe 2: Prokaryonten P7; Gruppe 3: *Drosophila melanogaster* und *C. elegans*; Gruppe 4: SLC10-Carrier und Gruppe 5: ACR3-Carrier. Für weitere Analysen wurden folgende 32 P7-verwandte Sequenzen ausgewählt: (in Klammer NCBI-Zugangsnummer):

- 17 P7-Sequenzen aus Bakterien: *Shigella flexneri* (AE005674); *Pseudomonas aeruginosa* (AE004629); *Caulobacter crescentus* (AE005840); *Escherichia coli* (NC_000913); *Erwinia carotovora* (BX950851); *Pseudomonas putida* (NC_002947); *Yersinia pestis* (NC_004088); *Brucella abortus* (NC_006932); *Salmonella enterica* (NC_006511); *Burkholderia ambifaria* (NZ_AAJO1000001); *Ralstonia eutropha* (NC_007347); *Pseudomonas syringae* (NC_005773); *Cytophaga hutchinsonii* (NZ_AABD03000002); *Mesorhizobium* sp. (AAED02000004); *Ralstonia solanacearum* (AL646070); *Corynebacterium diphtheriae* (NC_002935); *Propionibacterium acnes* (NC_006085)
- 15 P7-Sequenzen aus Eukaryonten: *Homo sapiens* P7 (DQ122860); *Rattus norvegicus* P7 (AY825929); *Mus musculus* P7 (AY825926); *Xenopus laevis* P7 (DQ122862); *Gallus gallus* (CR406993); *Canis familiaris* (XM_850079); *Bos taurus* (XM_865472); *Pan troglodytes* (XM_526698); *Danio rerio* (XM_678034); *Arabidopsis thaliana* (NM_115474); *Oryza sativa* (AP005110); *Saccharomyces cerevisiae* (AY692713); *Debaryomyces hansenii* (CR382137); *Kluyveromyces lactis* (XM_456283); *Emiliana huxleyi* (AY342361).

Die Sequenzverwandtschaft dieser Proteine aus dem Tier- und Pflanzenreich wurde berechnet (**Tab. 10**). Diese Ergebnisse zeigen, dass P7 von Wirbeltieren und Bakterien eine hohe Sequenzidentität von > 20 % aufweisen. Im Gegensatz dazu zeigt P7 der Wirbeltiere eine geringere Sequenzidentität zu P7 von Pflanzen und Hefen (> 18 %). Die höchste Homologie unter den P7 Proteinen der Wirbeltiere existiert zwischen Ratte und Maus (98 %), während *S. flexneri* und *E. coli* in der Gruppe der Bakterien die am meisten identischen P7 Proteine enthalten (99 %). Zwischen beiden Gruppen (Wirbeltiere und Bakterien) sind *X. laevis* P7 und P7 von *E. carotovora* am nächsten verwandt (24 %). P7 Proteine von Wirbeltieren, Pflanzen, Hefen und Bakterien haben eine vergleichbare Länge (330-450 Aminosäuren) und eine vergleichbare Membrantopologie (9-10 TMDs) (**Tab. 11**).

Tab. 10. Sequenzverwandtschaft der P7 Proteine von Wirbeltieren, Pflanzen, Hefen und Bakterien. Die Zahlen geben die Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen in Prozent an und beruhen auf einem Alignment mit Hilfe des Programmes *DNASTAR* 3.1.7 und der Funktion „sequence distances“.

	<i>H. sapiens</i>	<i>M. musculus</i>	<i>R. norvegicus</i>	<i>C. familiaris</i>	<i>G. gallus</i>	<i>X. laevis</i>	<i>A. thaliana</i>	<i>O. sativa</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>D. hansenii</i>	<i>K. lactis</i>	<i>C. crescentus</i>	<i>B. abortus</i>	<i>B. ambifaria</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. putida</i>	<i>E. carotovora</i>	<i>Y. pestis</i>	<i>S. enterica</i>	<i>S. flexneri</i>	<i>E. coli</i>
<i>H. sapiens</i>	100	94.7	94.4	87.1	85.3	87.1	19.7	20.6	18.8	19.4	18.2	20.5	19.3	21.8	21.3	21.9	23.3	22.1	21.7	22.0	22.0
<i>M. musculus</i>		100	97.6	85.6	84.7	85.3	19.4	20.3	18.8	20.0	18.8	20.8	19.6	22.9	21.3	22.8	23.0	21.5	22.3	22.9	22.9
<i>R. norvegicus</i>			100	85.3	84.1	85.6	19.1	19.4	19.1	20.3	18.2	21.1	20.6	22.4	21.0	22.8	23.3	22.1	22.6	22.9	22.9
<i>C. familiaris</i>				100	85.0	84.5	19.8	19.5	19.0	18.4	19.5	20.5	19.3	21.0	21.3	21.9	23.3	21.9	21.7	22.0	22.0
<i>G. gallus</i>					100	90.1	18.9	18.3	18.9	19.2	18.9	19.5	14.6	18.9	20.4	19.5	22.7	21.6	19.6	19.9	19.9
<i>X. laevis</i>						100	19.2	19.5	19.0	19.2	17.5	21.7	20.6	21.6	22.2	23.1	23.9	22.8	22.9	22.6	22.6
<i>A. thaliana</i>							100	50.8	11.3	13.1	12.4	19.9	18.1	18.4	18.0	19.8	19.7	18.1	18.1	18.4	18.4
<i>O. sativa</i>								100	11.8	15.8	15.1	19.0	16.8	17.0	18.0	17.7	15.8	16.7	16.6	16.6	16.9
<i>S. cerevisiae</i>									100	50.2	58.8	19.9	15.6	15.9	16.5	16.8	16.4	16.4	18.4	17.5	17.5
<i>D. hansenii</i>										100	53.6	16.0	16.8	17.6	17.4	18.3	14.8	16.7	14.5	14.8	14.8
<i>K. lactis</i>											100	17.5	16.2	15.3	16.8	15.3	14.8	15.2	14.8	15.1	15.1
<i>C. crescentus</i>												100	52.0	50.1	52.3	50.5	52.1	51.0	49.1	49.1	49.1
<i>B. abortus</i>													100	55.5	56.1	56.7	50.5	48.9	50.2	51.4	51.7
<i>B. ambifaria</i>														100	63.7	57.7	54.2	50.3	50.3	51.2	51.2
<i>P. aeruginosa</i>															100	70.3	56.4	55.6	55.7	57.2	57.2
<i>P. putida</i>																100	54.5	53.8	55.7	57.2	57.2
<i>E. carotovora</i>																	100	84.5	62.4	63.6	63.6
<i>Y. pestis</i>																		100	60.2	62.0	62.0
<i>S. enterica</i>																			100	91.3	91.3
<i>S. flexneri</i>																				100	99.7
<i>E. coli</i>																					100

Tab. 11. P7-verwandte Sequenzen von Wirbeltieren, Pflanzen, Hefen und Bakterien.

	Spezies	Nucleotid (Accession No.)	cDNA (bp)	Protein (Accession No.)	Länge (aa)	TMDs*	pI [#]	MW [#] (kDa)
Wirbeltiere	<i>H. sapiens</i>	DQ122860	1023	AAZ32256	340	10	9.68	37.4
	<i>M. musculus</i>	AY825926	1023	AAV80709	340	10	9.71	37.2
	<i>R. norvegicus</i>	AY825929	1023	AAV80712	340	10	9.68	37.3
	<i>C. familiaris</i>	XM_850079	1032	XP_855172	343	10	9.40	37.9
	<i>G. gallus</i>	AJ720456	1002	CAG32115	334	8	9.72	36.7
	<i>X. laevis</i>	DQ122860	1032	AAZ32258	343	10	9.54	37.8
Pflanzen/ Hefen	<i>A. thaliana</i>	NM_115474	1311	NP_191175	436	9	9.91	46.5
	<i>O. sativa</i>	AP005110	1272	BAD28409	423	10	10.40	44.4
	<i>S. cerevisiae</i>	AY692713	1305	AAT92732	434	9	9.01	48.3
	<i>D. hansenii</i>	CR382137	1347	CAG88030	448	10	6.51	49.9
	<i>K. lactis</i>	XM_456283	1353	XP_456283	450	10	7.91	50.2
Bakterien	<i>C. crescentus</i>	NZ_AAJZ01000001	999	ZP_00700430	332	9	9.21	35.4
	<i>B. abortus</i>	NC_006932	966	YP_221773	321	10	10.07	34.5
	<i>B. ambifaria</i>	NZ_AAJL01000001	1044	ZP_00684603	347	9	10.51	36.3
	<i>P. aeruginosa</i>	AE004629	1002	AAG05414	333	10	9.47	35.7
	<i>P. putida</i>	NC_002947	1002	NP_745021	333	9	9.23	35.4
	<i>E. carotovora</i>	BX950851	993	CAG75171	330	9	9.42	35.5
	<i>Y. pestis</i>	NC_004088	1029	NP_669414	342	9	8.92	37.0
	<i>S. enterica</i>	NC_006511	999	YP_149763	332	10	9.60	36.0
	<i>S. flexneri</i>	AG005674	999	AAN43972	332	10	9.63	36.5
	<i>E. coli</i>	NC_000913	999	NP_416905	332	10	9.53	36.4

*Vorhergesagte Transmembrandomänen (TMDs) wurden mithilfe des Programms HMMTOP analysiert;
[#]Isoelektrischer Punkt (pI) und Molekulargewicht (MW) wurden mit dem Programm PeptidMass (Wilkins et al. 1997) berechnet.

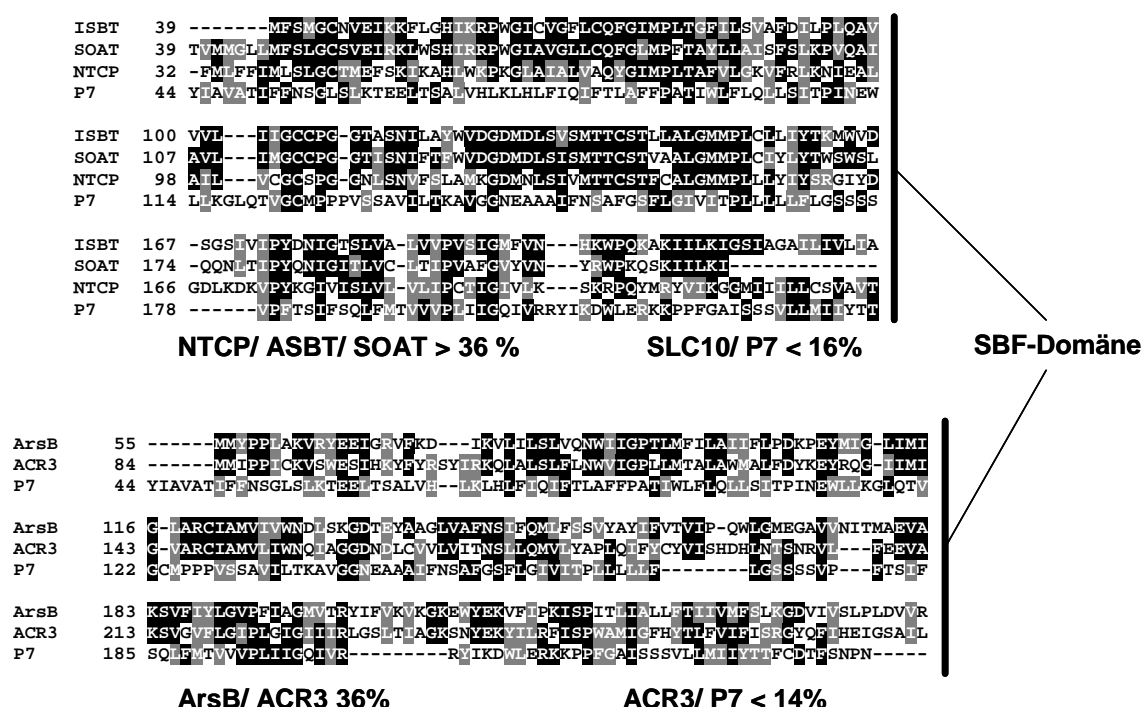


Abb. 29. Vergleich der SBF-Domänen von P7 und klassischen SLC10- und ACR3-Carrier. Die SBF-Domäne ist innerhalb der jeweiligen Familien sehr hoch konserviert, wobei die SBF-Domäne von Human P7 eine sehr geringe Homologie zu den anderen zeigt. Für die Analyse wurden die SBF-Domänen von NTCP, ASBT und SOAT des Menschen sowie die von ACR3 der Hefe *S. cerevisiae* und ArsB des Bakteriums *B. subtilis* benutzt.

Die SBF-Domäne zeigt eine gut definierte Architektur und kommt in allen bisher charakterisierten Mitgliedern der SLC10- und ACR3-Familien vor. Die SBF-Domäne der klassischen SLC10- (NTCP, ASBT und SOAT von Mensch) und ACR3-Carrier (ACR3 von *S. cerevisiae* und ArsB von *B. subtilis*) wurden mit der SBF-Domäne von Human P7 verglichen. Die SBF-Domäne ist innerhalb der SLC10- und ACR3-Familien sehr hoch konserviert (> 36 %), während die SBF-Domäne von Human P7 weniger als 16 % Sequenzidentität zu den anderen SBF-Domänen zeigt (**Abb. 29**).

6. Diskussion

6.1 Das „Sodium Bile acid Family Domain Containing Protein 7“ SBFDCP7

Vor nun 3 Jahren bestand die SLC10-Familie aus nur zwei Mitgliedern, NTCP und ASBT, welche Gallensäuren transportieren und eine wichtige physiologische Funktion in der Aufrechterhaltung des enterohepatischen Kreislaufs der Gallensäuren ausüben (Hagenbuch und Dawson 2004). Im Laufe der drei folgenden Jahre wurden neue Mitglieder dieser Familie identifiziert und kloniert. Einer dieser neuen Mitglieder, der SOAT, transportiert keine Gallensäuren, sondern Steroidsulfate, was das bisherige Verständnis der „Familie der Gallensäuretransporter“ grundlegend veränderte (Geyer et al. 2004). Im selben Jahr wie SOAT wurden auch die P7 Sequenzen in den öffentlichen Datenbanken eingetragen und zunächst als neue potentielle Gallensäuretransporter angesehen. Weil P7 das 7. Säugetierprotein ist, welches die SBF-Domäne enthält, wurde der Name SBFDCP7 „Sodium Bile acid Family Domain Containing Protein 7“ vorgeschlagen, um diese Proteine zu benennen. Die in dieser Arbeit klonierten SBFDCP7 Proteine sind mit den Bakterien SBFDCP7 am nächsten verwandt (> 20 % Aminosäuresequenzidentität) und es wird vermutet, dass diese Proteine Stellvertreter einer neuen Genfamilie sind. In diesem Teil der Doktorarbeit werden zahlreiche Beweise, die diese Hypothese unterstützen, näher diskutiert.

6.2 SBFDCP7: Phylogenie

Mit 37 repräsentativen Proteinsequenzen der SLC10-, ACR3- und SBFDCP7-Familien wurde ein phylogenetischer Baum der SBF-Familie erstellt. SBFDCP7-Proteine der Wirbeltiere haben eine höhere Sequenzidentität zu verschiedenen Bakterien-Proteinen ($> 20\%$) als zu Pflanzen- und Hefen-Proteinen ($> 18\%$). Deshalb wurden die SBFDCP7-verwandten Proteine von Pflanzen und Hefen für die Analyse nicht berücksichtigt. Der Baum zeigt deutlich die Existenz von drei gut definierten Familien: ACR3, SBFDCP7 und SLC10 (**Abb. 30**). Die Sequenzidentität ist $> 20\%$ innerhalb der SLC10- und SBFDCP7-Familien und $> 32\%$ innerhalb der ACR3-Familie. Dagegen zeigen die SBFDCP7 Proteine weniger als 15% Sequenzidentität zu den SLC10- und ACR3-Carriern.

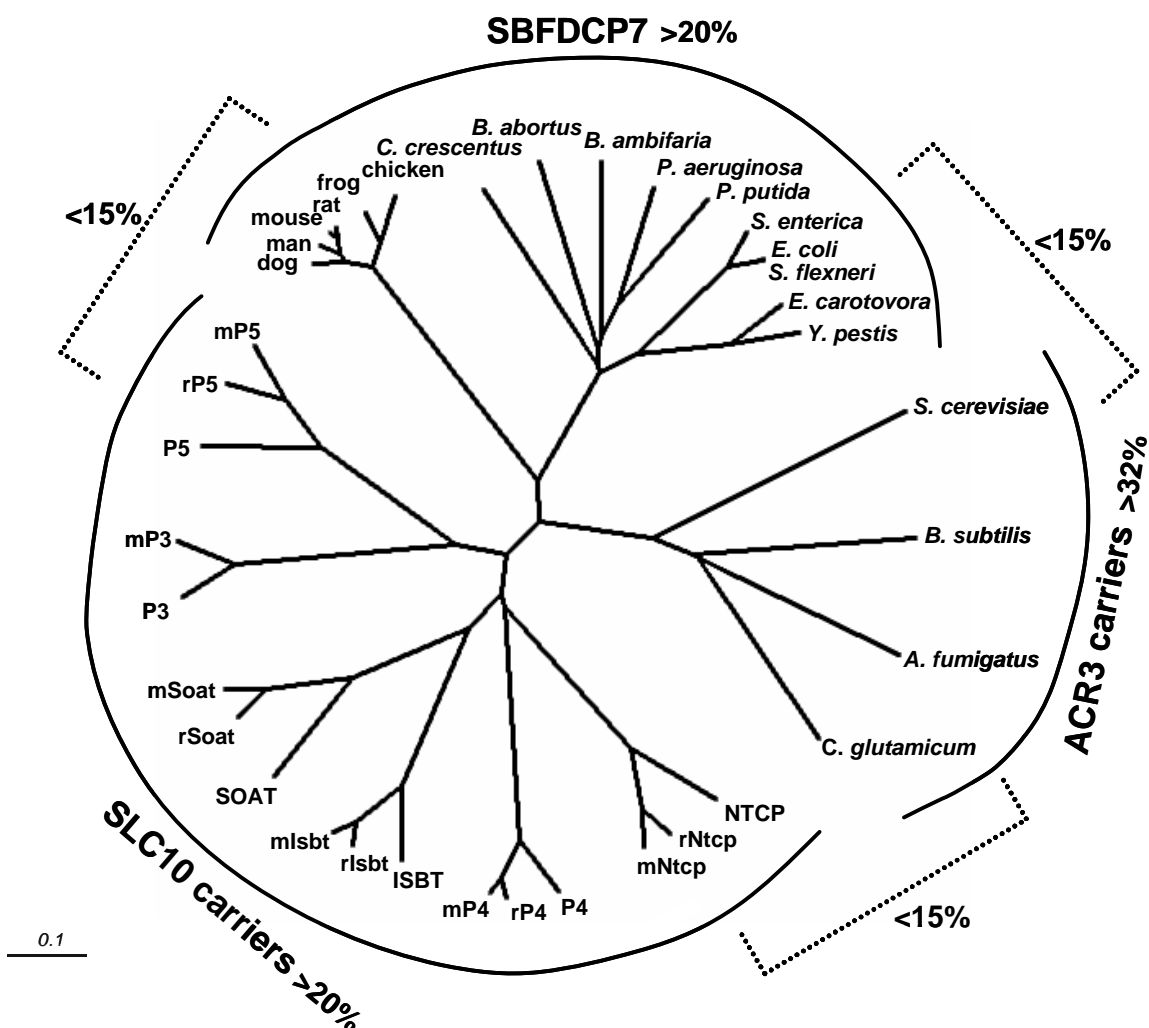


Abb. 30. Phylogenetischer Baum der SBF-Superfamilie. Im Baum inbegriffen sind Proteine von Wirbeltieren, Hefen und Bakterien. Die Darstellung beruht auf einem Alignment der Proteinsequenzen der gezeigten Transporter. Das Alignment wurde mit dem Programm TreeView (Page 1996) als Baum dargestellt. In der SLC10-Familie sind humane Proteine groß geschrieben. SLC10-Carrier von Ratte und Maus sind mit den Präfixen „r“ und „m“ gekennzeichnet. SBFDCP7-Proteine von Huhn und Hund stammen aus Ensembl (<http://www.ensembl.org>) und HomoloGene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). SBFDCP7-Proteine von Bakterien wurden durch eine BLAST-Suche identifiziert.

Nach den Richtlinien des *Human Genome Nomenclature Committee* (HGNC) wird ein neues Protein einer bestehenden Genfamilie zugewiesen, wenn es mindestens 20-25 % Sequenzidentität zu bereits entstandenen Mitgliedern dieser Familie hat (Hediger et al. 2004). Die SBFDCP7 Proteine erfüllen diese Voraussetzung nicht und sollten daher nicht in die SLC10-Familie integriert werden. Die Sequenzidentität aller SBFDCP7-Proteine bewegt sich zwischen 20 % und 97 %. Nach den in dieser Arbeit vorgestellten Daten zur Phylogenie, genomischen Organisation, Membrantopologie und Funktion, stellen die SBFDCP7 Sequenzen eine eigene neue Genfamilie dar, deren Mitglieder in Wirbeltieren, Pflanzen, Hefen und Bakterien zu finden sind. Die SBFDCP7-Proteine sind im Cluster der Wirbeltiere mit einer Sequenzidentität von > 84 % am höchsten konserviert, gefolgt von Pflanzen (> 50 %), Hefen (> 50 %) und Bakterien (> 48 %). Aus diesen hohen Sequenzähnlichkeiten ergibt sich der Schluss, dass alle SBFDCP7-Gene auf ein einziges gemeinsames Vorläufer-Gen zurückgehen.

6.3 SBFDCP7: Genomische Organisation

SBFDCP7- und SLC10-Familien unterscheiden sich nicht nur in ihrer phylogenetischen Entwicklung, sondern auch in der genomischen Organisation (**Abb. 31**). Während die SLC10-Gene ein (*SLC10A3* und *SLC10A5*) bis sechs (*SLC10A2* und *SLC10A6*) Exone besitzen (Geyer et al. 2006), sind die *SBFDCP7*-Gene in 12 Exonen organisiert. Die *SBFDCP7*-Gene sind damit wesentlich komplexer und auch länger als die *SLC10*-Gene. Die *SBFDCP7*-Gene codieren für Proteine mit gleicher Länge in Mensch, Ratte und Maus. Diese drei Gene sitzen synthenisch in unterschiedlichen Gen-Loci: Human *SBFDCP7* auf dem Chromosom 4, Ratte auf 19 und Maus auf Chromosom 8.

6.4 SBFDCP7: Alternatives Spleißen

Eine besondere Eigenschaft der *SBFDCP7*-Gene ist die Bildung von zahlreichen Transkriptionsvarianten, wie hier für Mensch und Maus P7 gezeigt wurde. Drei Transkriptionsvarianten (Varianten 1 bis 3 bei Mensch und Maus) sind in dieser Arbeit kloniert worden und weitere sind in der GenBank eingetragen. Diese werden als Variante 4 von Mensch (GenBank CR933647) und Varianten 4 (AK165983) und 5 (AK079901) von Maus bezeichnet. Einige dieser Transkriptionsvarianten verändern nicht den Leseraster (Variante 1 und 3 von Maus, 1 von Mensch), während andere dies tun und zur Bildung vorzeitiger Stop-Codons und dadurch C-Terminal-trunkierter Proteine führen. Obwohl die physiologische Bedeutung der Transkriptionsvarianten der SBFDCP7-Familie noch unklar ist, dienen diese vermutlich der Regulation der P7-Expression in Analogie zu Beispielen von anderen Transportproteinen (Gamba 2001).

Als die Genome von Mensch, Ratte, Maus, Rind und Hund entziffert wurden, war die Genzahl dieser Spezies eine Überraschung. Der Mensch, mit seinen ~25.000 Genen, besitzt nur 46 %

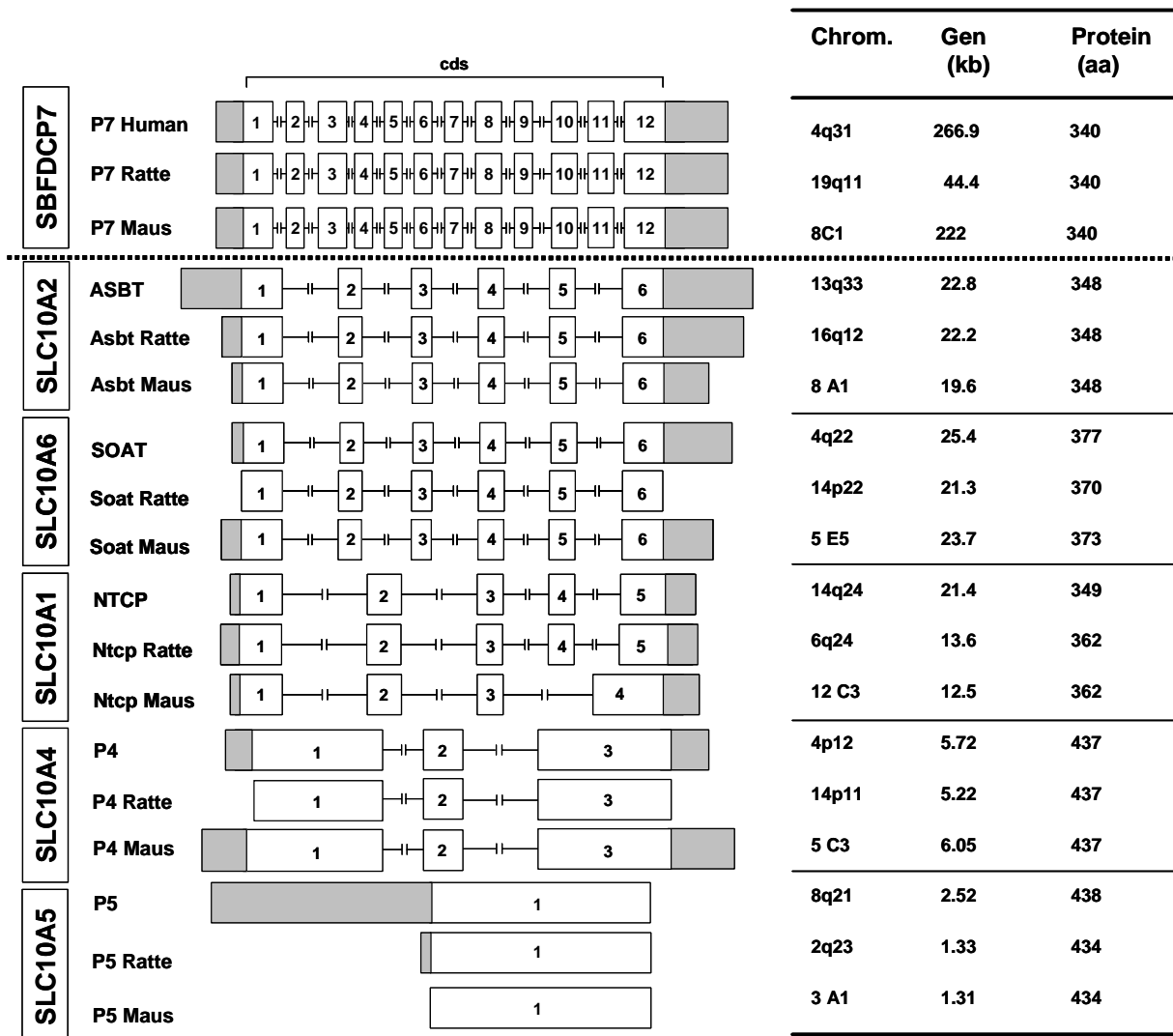


Abb. 31. Genomische Organisation der SLC10- und SBFDCP7-Gene. Exone sind als Boxe und Introne als Linien dargestellt. Codierende (cds) und nicht-codierende Bereiche (in grau) sowie Chromosom, Gen- und Protein-Länge sind gezeigt.

mehr Gene als die Taufliege *D. melanogaster* und 24 % mehr als der Fadenwurm *C. elegans*. In Wirklichkeit steht jedoch die Komplexität eines Organismus nicht in Beziehung mit der Genzahl, sondern mit anderen regulatorischen Mechanismen, wie etwa dem Prozess des alternativen Spleißens (Graveley 2001). Durch das alternative Spleißens kann pro Gen mehr als eine mRNA Spezies und auch mehr als ein Protein gebildet werden (Graveley 2001). Damit ist es einer menschlichen Zelle möglich, mehr als 90.000 Proteine zu bilden, ohne über die entsprechende Anzahl an Genen zu verfügen (Ast 2004). Der Prozess des alternativen Spleißens ist neben P7 für viele weitere Membrantransporter beschrieben worden (Gamba 2001). Das erste identifizierte Gen

der „*organic cation Transporter*“ Familie, *OCT1*, generiert durch alternatives Spleißen zwei Isoformen, den 556 Aminosäuren-langen *OCT1* und den 430 Aminosäuren-langen *OCT1a*, der von einer im zweiten Exon geskippten Variante gebildet wird. Bei der Isoform *OCT1a* fehlen die 2 ersten Transmembrandomänen mit dem ersten extrazellulären Loop und 3 Glykosylierungsstellen. Trotzdem wird die Funktion des Proteins nicht gestört (Gamba 2001). Alternatives Spleißen kann aber das Protein-Sorting verändern, wie es bei Asbt der Ratte beschrieben wurde (Lazaridis et al. 2000). Das Skipping des zweiten Exons des *Slc10a2*-Gens generiert die trunkierte Isoform t-Asbt. Im Gegensatz zu dem intakten Asbt, der in der apikalen Plasmamembran der Cholangiozyten exprimiert wird und Gallensäuren aufnimmt, ist der t-Asbt in der basolateralen Membran der Zellen lokalisiert und vermittelt einen Efflux-Transport von Gallensäuren (Lazaridis et al. 2000). Des Weiteren wurde eine alternative Transkription auch für den Ntcp der Maus beobachtet (Cattori et al. 1999). Das Maus *Slc10a1*-Gen generiert zwei Isoformen von 362 Aminosäuren (Ntcp1) und 317 Aminosäuren (Ntcp2). Obwohl bei dem Ntcp2 34 Aminosäuren am C-Terminus fehlen, wird die Funktion und Expression des Proteins nicht verändert (Cattori et al. 1999).

6.5 SBFDCP7: Expression und Membrantopologie

Unterschiede zwischen den SBFDCP7- und SLC10-Familien existieren auch auf Proteinebene. Nach Hydrophobizitätsanalysen besitzen alle SBFDCP7-Proteine, von *E. coli* bis *Homo sapiens*, 9- bis 10-TMDs (**Abb. 32.B und C**). Die 10-TMD-Topologie wurde in dieser Arbeit für Human und Ratte SBFDCP7 experimentell bewiesen. Weiterhin wurde eine intrazelluläre *cis*-Orientierung des N- und C-Terminus gezeigt. Auch die ACR3-Carrier Acr3p und ArsB besitzen 10-TMDs (Bobrowicz et al. 1997, Sato und Kobayashi 1998). Im Gegensatz dazu wurden für die SLC10-Carrier, NTCP, ASBT und SOAT, 7 Transmembrandomänen mit einer $N_{\text{exo}}/C_{\text{cyt}}$ *trans*-Orientierung des N- und C-Terminus ermittelt (Geyer et al. 2006; Banerjee und Swaan 2006).

SBFDCP7 wird im Organismus breit exprimiert, unter anderem in Herz, Gehirn, Dünndarm, Dickdarm und Nebenniere und codiert für ein Protein von 27 kDa bei Mensch und Ratte. Dies ist deutlich geringer als das errechnete Molekulargewicht von 37 kDa. Gegen eine Abspaltung von Zuckerresten spricht, dass in P7-Proteinen keine Asparagin-assoziierte Glykosylierungsstellen existieren. Außerdem wurde in dieser Arbeit eine post-translationelle Abspaltung des N-Terminus ausgeschlossen. Bei Membrantransportern wird aber häufig 65-75% ihres vorausgesagten Molekulargewichts beobachtet (Ward et al. 2000).

Ein gemeinsames Merkmal aller SBFDCP7-Proteine sind zahlreiche Proteindomänen, die von *E. coli* bis Mensch hoch konserviert sind (**Abb. 32.A und B**). Besonders hoch konserviert sind die Aminosäuren in den Transmembrandomänen 5, 7, 9 und 10. Konservierte geladene Aminosäuren sind in der zytoplasmatischen Domäne der Proteine zu finden (Position bei Mensch R^{188} , R^{197} , K^{199} , R^{258} und D^{167}). Die einzige konservierte Aminosäure, welche transmembranär vorkommt, ist Lysin

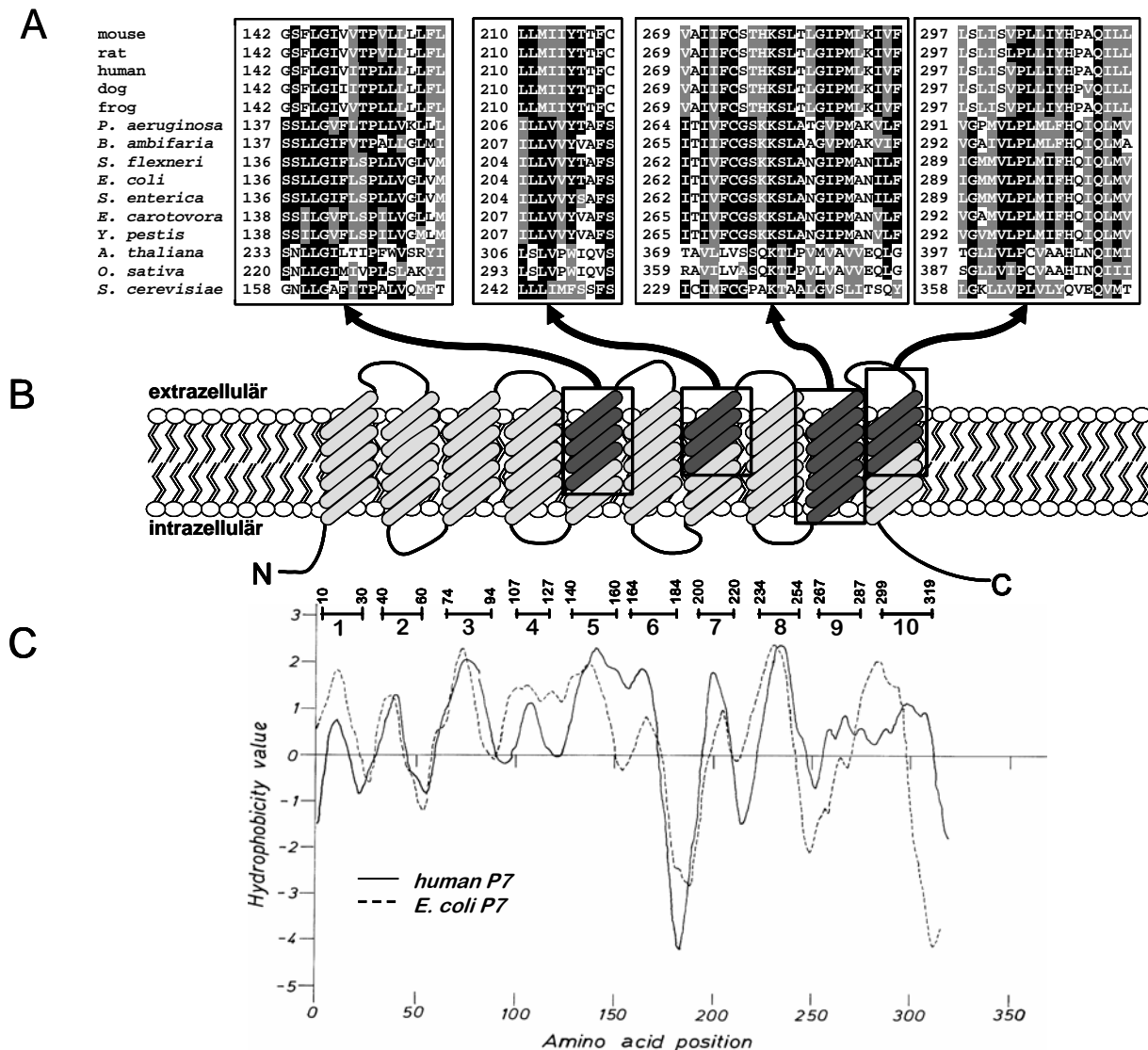


Abb. 32. Vergleich der Membrantopologie und Aminosäuresequenzen eukaryotischer und prokaryotischer Mitglieder der SBFDCP7-Familie. A) Konservierte Proteindomänen in den SBFDCP7-Proteinen. Aminosäuresequenzen wurden mit dem Programm *ClustalW* angepasst und mit *BOXSHADE 3.21* dargestellt. B) Lokalisation der konservierten Proteindomänen in dem Transmembranmodell des humanen SBFDCP7. C) Hydrophobizitätsprofile von Human und *E. coli* SBFDCP7. Die Y-Achse entspricht dem Hydrophobizitätswert und die X-Achse zeigt die Aminosäurepositionen in den jeweiligen Sequenzen an. Die Position der entsprechenden Transmembrandomänen des humanen SBFDCP7-Proteins ist mit den Nummern 1 bis 10 gekennzeichnet.

in der 9. TMD (Position bei Mensch K²⁷⁸). Insgesamt besitzen die SBFDCP7-Proteine 50 konservierte Aminosäuren, davon 9 Leucine, 8 Glycine, 7 Proline und 7 Phenylalanine.

Das „Signatur-Motif“ der SBFDCP7-Familie KSL-(T,A)-X-GIPM ist in der 9.-TMD lokalisiert. Die plausibelste Erklärung für die Konservierung dieser Aminosäuren in den SBFDCP7-Proteinen verschiedener Arten ist, dass gerade diese Aminosäuren besonders eng mit der Funktion des SBFDCP7-Proteins verknüpft sind.

6.6 SBFDCP7: mögliche Funktionen

NTCP stellt das wichtigste Natrium-abhängige Transportsystem für Taurocholat in Hepatozyten dar (Hagenbuch und Meier 1994, Weinman 1997, Trauner und Boyer 2003, Kullak-Ublick et al. 2004). NTCP transportiert neben Gallensäuren auch sulfatierte Steroide (Estron-3-sulfat und DHEAS) (Craddock et al. 1998, Schroeder et al. 1998, Kullak-Ublick et al. 2000, Hata et al. 2003) und interagiert mit Arzneistoff-konjugierten Gallensäuren (Kullak-Ublick et al. 1997). Im Gegensatz dazu transportiert der Natrium-abhängige Gallensäuretransporter des Dünndarms ASBT ausschließlich Gallensäuren und wird in Dünndarm und Cholangiozyten exprimiert (Wong et al. 1994, Wong et al. 1995, Shneider et al. 1995, Kramer et al. 1999, Saeki et al. 1999). Beide Transporter sind für die Aufrechterhaltung des enterohepatischen Kreislaufs der Gallensäuren wichtig (Shneider 2001, Meier und Stieger 2002, Trauner und Boyer 2003, Kullak-Ublick et al. 2004, Marin et al. 2005). Deshalb wurde die SLC10-Familie auch lange Zeit als die „Familie der Gallensäuretransporter“ bezeichnet (Hagenbuch und Dawson 2004). Aufgrund einer gewissen Sequenzverwandtschaft von SBFDCP7 zu NTCP/ASBT lag nach der Klonierung zuerst die Vermutung nahe, dass es sich bei SBFDCP7 auch um einen Gallensäuretransporter handelt. Diese Hypothese wurde in dieser Arbeit jedoch experimentell widerlegt.

Viele, wenn nicht alle Lebewesen, haben im Laufe der Evolution Arsenit-Entgiftungsmechanismen entwickelt. Diese Mechanismen können in 3 Schritten zusammengefasst werden: I) Aufnahme von Arsenat (As(V)) oder Arsenit (As (III)) aus dem extrazellulären Milieu, II) Reduktion von Arsenat zu Arsenit durch eine Metalloreduktase, und III) entweder Extrusion von Arsenit oder Speicherung in der Vakuole. Im Gegensatz zu Bakterien und Hefen, bei denen die Arsenit-Resistenz ausführlich studiert wurde (Wysocki et al. 1997; Bobrowycz et al. 1997; Sato und Kobayashi 1998; Rosen 2002), sind bei Säugetieren diese Mechanismen unvollständig bekannt (**Abb. 33**). Am Eindringen von Arsenit in die Zelle sind einige Aquaglyceroporine (AQP7 und AQP9 bei Menschen) beteiligt (Liu et al. 2002). Als Efflux-Transporter für Arsenit wurde das humane MRP1 (*multidrug resistance-associated protein 1*) postuliert. So zeigten MRP1-exprimierende HeLa-Zellen einen Glutathion-abhängigen Arsenit-Transport (Leslie et al. 2004). Weitere Mrp-Carrier (Mrp2-7) könnten auch in die Schutzfunktion vor der Arsenit-Toxizität involviert sein (Leslie et al. 2004). Bisher ist jedoch noch unklar, von welchem Transportsystem Arsenat aufgenommen und später zu Arsenit reduziert wird (**Abb. 33**).

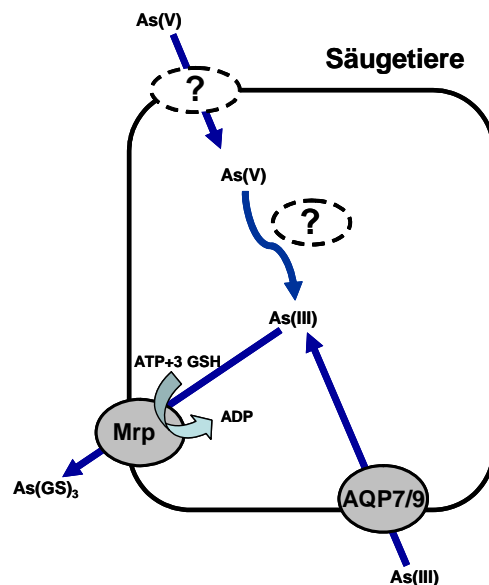


Abb. 33. Arsenit-Entgiftung bei Säugetieren. Arsenit dringt durch ein Aquaporin (bei Menschen AQP7 und AQP9) in die Zelle ein, während Arsenat von einem bisher unbekannten Transporter aufgenommen wird. Das für die Reduktion von Arsenat verantwortliche Protein ist noch nicht identifiziert worden. In Säugetieren wird Arsenit von den Efflux-Pumpen der MRP-Familie in das extrazelluläre Milieu ausgeschleust.

Obwohl SBFDCP7 eine geringe Sequenzidentität zu den ACR3-Carriern zeigt, kann ein Arsenit-Transport für SBFDCP7 nicht ausgeschlossen werden. Die Bedeutung dieser Fragestellung ist offenkundig. Aus Zeitgründen (Dauer meines Stipendiums durch den KAAD) konnte sie im Rahmen dieser Dissertation noch nicht beantwortet werden. Allerdings werden entsprechende Versuche unter meiner Beteiligung in absehbarer Zeit noch durchgeführt werden.

In den Genomen von Eukaryonten, insbesondere von Tieren und Pflanzen, werden häufig Pseudogene gefunden, wie sie ursprünglich in der Gruppe der Globin-Gene beschrieben wurden (Little 1982). Pseudogene sind Überreste evolutionärer Vorgänge, die ganz ähnlich wie funktionelle Gene sind, aber ihr Protein-codierendes Leseraster verloren haben. Sie können auch durch Mutationen inaktiviert werden, welche Initiationssignale der Transkription zerstören, das Spleißen an den Exon/ Intron-Grenzen blockieren oder die Translation vorzeitig beenden (Yao et al. 2006). Da Pseudogene für einen Organismus keinen Selektionsvorteil bringen, häufen sie Mutationen an und sind nach einer bestimmten Zeit nicht mehr als Gen identifizierbar. Das *SBFDCP7*-Gen wird dagegen Gen-spezifisch exprimiert und codiert für ein Protein, welches in Sequenz und Länge zwischen wenig verwandten Spezies hoch konserviert ist. Damit handelt es sich bei *SBFDCP7* sicher nicht um ein Pseudogen.

Die *SBFDCP7*-Gene werden im Organismus sehr breit exprimiert, was eine „housekeeping gene“ Funktion vermuten zulässt. Da SBFDCP7-Proteine von Mensch und Ratte in den HEK293-Zellen in der Zellmembran lokalisiert sind und die verwandten Proteine, SLC10- und ACR3-Carrier, Membrantransporter sind, wird auch für die SBFDCP7-Proteine eine Funktion als

Membrantransporter vermutet. SBFDCP7-Proteine von Bakterien wurden nach Berechnungen von PSORT-B (Gardy et al. 2003) mit einer hohen Wahrscheinlichkeit in der Zellmembran der Bakterien exprimiert. Dort wird die Aufnahme von Nährstoffen und die Elimination von Abfallsprodukten von Transportsystemen ausgeübt (Saidijam et al. 2005). Beispiele für bakterielle Transporter sind Peptid-Transporter der PTR-Familie wie DtpT von *L. lactis* (Daniel et al. 2006), der *ATP-binding cassette* (ABC) Carrier LmrA von *E. coli* (van Veen et al. 1996) und Mitglieder der *major facilitator* Superfamilie (MFS) wie der Arabinose-Transporter AraE von *E. coli* (Marger und Saier 1993). In Pflanzen sind Transportsysteme für die Aufrechterhaltung ihres autotrophischen Status essentiell. Die H⁺-ATPase von *A. thaliana* und der H⁺-Hexose Cotransporter (HUP1) von *C. kessleri* sind die ersten auf molekularer Ebene identifizierten Transportproteine von Pflanzen (Dreyer et al. 1999). Außerdem besitzen Pflanzen Transportsysteme für Sucrose, Aminosäuren, Peptide, Ammonium, Kupfer, Sulphate, Calcium, Eisen und Zink (Dreyer et al. 1999). Daher kann zu Recht die Hypothese aufgestellt werden, dass SBFDCP7 eine essentielle strukturelle oder physiologische Funktion als Membrantransporter in Bakterien, Pflanzen, Hefen und Wirbeltieren ausübt.

6.7 SBFDCP7: Taxonomische Aufgliederung

Viele Proteinfamilien sind nur auf einen der drei Zweige des Lebens (Archaea, Bakteria und Eukaryonten) begrenzt. Andere sind „ubiquitär“ und kommen in allen drei Zweigen vor, wie die Proteine der ABC- und MFS-Familie (*Major Facilitator Superfamily*) (Marger und Saier 1993) und die hier beschriebene SBFDCP7-Familie. Die Datenbank Pfam führt eine Liste aller Sequenzen, welche die SBF-Domäne enthalten. Proteine von Wirbeltieren sind dabei nur in den SLC10- und SBFDCP7-Familien zu finden. Außerdem ist die SBFDCP7-Familie die einzige unter den SBF-Familien, welche Proteine von Bakterien, Pflanzen, Hefen und Wirbeltieren beinhaltet (**Abb. 34**), während die SLC10- und ACR3-Familien auf Wirbeltiere bzw. Bakterien und Hefen begrenzt sind. Damit hat die SBFDCP7-Familie taxonomisch eine wesentlich breitere Präsenz als die SLC10- und ACR3-Familien.

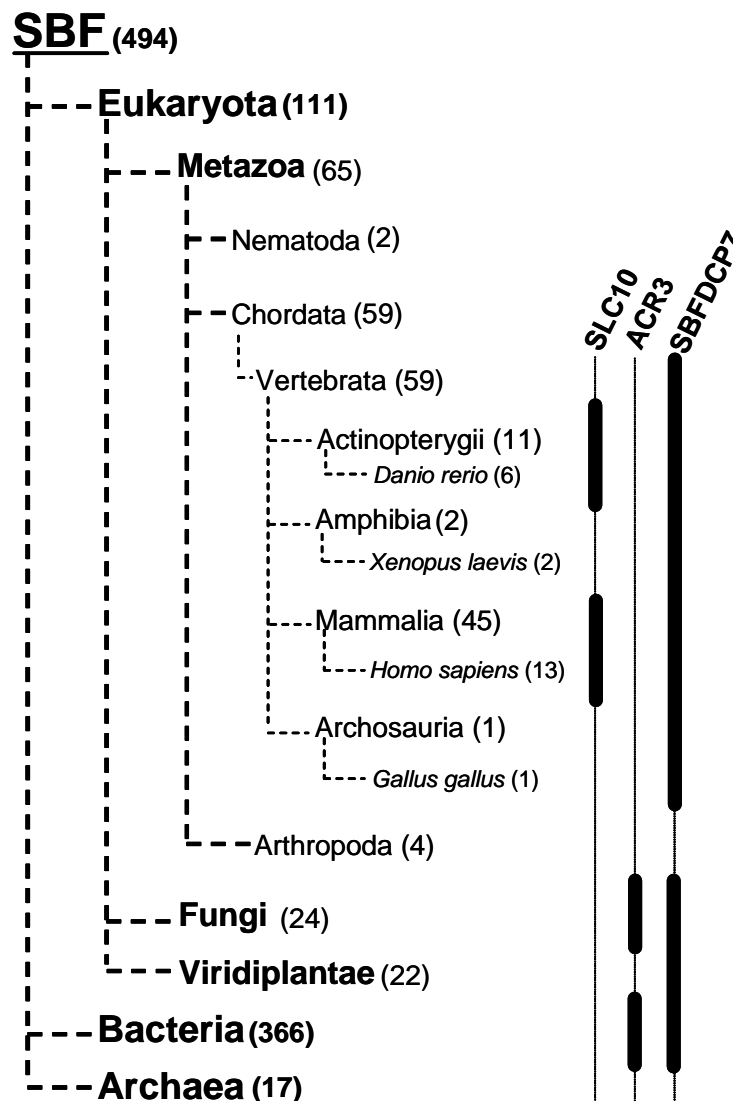


Abb. 34. Taxonomische Aufgliederung der SBF-Familien nach Angaben von Pfam (*Protein Family Database*, Stand 25.07.2006). In Klammer ist die Anzahl von Sequenzen pro Ast angegeben.

6.8 Perspektive

Die Entstehung des SBFDCP7-Gens bedeutete im Laufe der Evolution vermutlich einen Selektionsvorteil von *E. coli* bis *H. sapiens*. Nur so kann man sich die hohe Homologie in den Proteinsequenzen und Sekundärstrukturen erklären. Welche interessante Funktion steckt aber hinter den SBFDCP7 Proteinen? Diese Frage wird mit Sicherheit in den nächsten Jahren beantwortet werden. Die Erstellung von *knockout* Mäusen und P7-deletierten Bakterien sowie die funktionelle Ausschaltung durch andere Methoden wie z.B. RNAi-Techniken, wird eine entscheidende Rolle bei der funktionellen Charakterisierung dieser Proteinfamilie spielen.

7 Zusammenfassung

Die SBF-Proteindomäne (*Sodium Bile acid symporter Family domain*) kommt in zwei bereits charakterisierten Proteinfamilien vor, SLC10 und ACR3. Die ersten charakterisierten Mitglieder der SLC10-Familie sind die natriumabhängigen Gallensäuretransporter NTCP (*SLC10A1*) und ASBT (*SLC10A2*). Beide Transporter sind essentiell an der Aufrechterhaltung des enterohepatischen Kreislaufs der Gallensäuren beteiligt. In den letzten zwei Jahren wurden am Institut für Pharmakologie und Toxikologie vier neue Mitglieder (*SLC10A3* bis 6) dieser Proteinfamilie identifiziert. Eines dieser Mitglieder, der SOAT (*SLC10A6*), transportiert keine Gallensäuren, sondern sulfatierte Steroide. Damit wurde offensichtlich, dass nicht alle Mitglieder der SLC10-Familie Gallensäuretransporter sind, was das bisherige Verständnis von der „Familie der Gallensäuretransporter“ grundlegend veränderte. Mitglieder der ACR3-Familie wurden ausschließlich in Hefen und Bakterien identifiziert und vermitteln einen Arsenit-resistenten Phänotyp. In der vorliegenden Arbeit wird ein neues Protein, genannt P7, von Mensch, Ratte, Maus und Frosch beschrieben. Diese Proteine wurden kloniert und charakterisiert. P7-Gene sind in 12 Exonen organisiert und bilden zahlreiche Transkriptionsvarianten. Drei dieser Varianten wurden in dieser Arbeit bei Mensch und Maus nachgewiesen und kloniert (P7 Variante 1 bis 3 bei Mensch und Maus). Die Variante 1 und 3 von Maus und 1 von Mensch verändern nicht das Leseraster, während Variante 2 und 3 von Mensch und 2 von Maus dies tun und zur Bildung vorzeitiger Stop-Codons und dadurch C-Terminal-trunkierter Proteine führen. P7-Gen wird im Körper sehr breit exprimiert, besonders stark in Herz, Gehirn, Leber, Milz, Dickdarm, Dünndarm und Nebenniere. P7-Proteine bestehen aus 340-343 Aminosäuren und zeigen über 85 % Sequenzidentität untereinander. Durch heterologe Expression in *X. laevis*-Oozyten wurden radioaktiv markierte Gallensäuren (Taurocholat, Cholat und Chenodeoxycholat), Steroidsulfate (Estron-3-sulfat, Dehydroepiandrosteronsulfat und Pregnenolonsulfat), Eicosanoide (Prostaglandin E₂ und Leukotriene C₄), Digoxin und Estron-17 β -Glucuronid getestet. Allerdings konnte keine Transportaktivität für die getesteten Substanzen nachgewiesen werden. Durch strategisch eingebaute HA- und FLAG-Epitope und anschließende Immunfluoreszenz wurde für P7 eine Membrantopologie von 10 Transmembrandomänen mit einem intrazellulär lokalisierten N- und C-Terminus bewiesen. P7 ist ein Protein von 27 kDa bei Mensch und Ratte und ist in der Plasmamembran lokalisiert. Der N-Terminus von P7 wird proteolytisch nicht gespalten.

Weil P7 das 7. Säugetierprotein ist, welches die SBF-Domäne enthält, wurde es als SBFDCP7 „*Sodium Bile acid Family Domain Containing Protein 7*“ bezeichnet. Neben den Vertebraten-Proteinen wurden zahlreiche SBFDCP7-verwandte Sequenzen von Bakterien, Pflanzen und Hefen, die noch nicht charakterisiert worden sind, identifiziert. Die phylogenetische Verwandtschaft der SBF-Familie wurde analysiert. Unter der SBF-Familie existieren drei gut definierte Unterfamilien: ACR3, SBFDCP7 und SLC10. Zu den Mitgliedern der SLC10- und ACR3-Familie

haben SBFDCP7 weniger als 15 % Sequenzidentität. Im Gegensatz dazu zeigen Vertebraten- und Bakterien-SBFDCP7 eine höhere Sequenzidentität (> 20 %). Damit hat die SBFDCP7-Familie die Besonderheit, im Gegensatz zu der SLC10- und ACR3-Familie, in allen drei Zweigen der belebten Natur vorzukommen, nämlich in Pflanzen, Bakterien und tierischen Lebewesen. SBFDCP7-Proteine zeigen eine vergleichbare Länge und Membrantopologie sowie zahlreiche konservierte Proteindomänen von *E. coli* bis Mensch, was auf eine konservierte physiologische Funktion hindeutet.

Mit dieser Arbeit sind die grundlegenden genomischen und biochemischen Erkenntnissen zu dieser Proteinfamilie sowie die Expression von vier neuen Proteinen aufgeklärt worden. Ebenso liegen in dieser Arbeit die ersten phylogenetischen Daten dieser neuen Proteinfamilie SBFDCP7 vor.

8 Summary

There are two well-characterized protein families, which contain the SBF protein domain (Sodium Bile acid symporter Family domain): SLC10 and ACR3. NTCP (SLC10A1) and ASBT (SLC10A2) are well-known sodium-dependent bile acid transporters. These carriers are essentially involved in the maintenance of the enterohepatic circulation of bile acids. In addition to NTCP and ASBT, we recently identified further members of the SLC10 family: SLC10A3 to A6. After the cloning of SOAT (SLC10A6), which specifically transports steroid sulfates but not bile acids it became evident that not all SLC10 members are bile acid transporters. The second SBF-family is referred to as ACR3 and is comprised of genes from bacteria and yeasts, which confer an arsenic-resistant phenotype. In this Ph.D. thesis a new protein, named P7, from man, rat, mouse, and frog, was cloned and characterized. P7 genes are organized in 12 exons and code numerous alternatively spliced transcription variants. Three variants from man and mouse were here identified and cloned. Variant 1 and 3 from mouse and variant 1 from man do not alter the open reading frame, whereas variant 2 and 3 from man and 2 from mouse conduct to premature stop codons and thus to C-terminal truncated protein isoforms. P7 genes are broadly expressed, among others, in heart, brain, liver, spleen, colon, small intestine, and adrenal glands. P7 proteins consist of 340-343 amino acids and have an overall sequence identity of > 85 %. P7 proteins were expressed heterologous in *X. laevis* oocytes and uptake studies with radioactive labelled bile acids (taurocholate, cholate, and chenodeoxycholate), steroid sulfates (estrone-3sulfate, dehydroepiandrosterone sulfate, and pregnenolone sulfate), eicosanoids (prostaglandine E₂ and leucotriene C₄), digoxine, and estrone-17 β -glucuronide, were conducted. However, no transport activity could be detected for these compounds. With strategically inserted HA- and FLAG-epitopes and immunofluorescence microscopy a membrane topology of 10 transmembrane domains was demonstrated strengthening that both N- and C-terminus are intracellularly localized. P7 are membrane proteins of 27 kDa in man and rat. The N-terminus is not splitted off by proteolysis. Because P7 represents the 7th mammalian protein, which contains the SBF-domain, it was named SBFDCP7 Sodium Bile acid Family Domain Containing Protein 7. Phylogenetic relationships of the SBF-Family were analyzed. There are three well-defined SBF subfamilies among the SBF-family, e.i. ACR3, SBFDCP7, and SLC10. Compared with SLC10 and ACR3 family members SBFDCP7 show < 15 % sequence identity. By contrast, vertebrates and bacteria SBFDCP7 are more identical (> 20 % sequence identity). In contrast to SLC10 and ACR3 families, members of the SBFDCP7 family exist within the three branches of living organisms, namely in bacteria, plants, and animals. P7 proteins from *E. coli* to man show a similar length and membrane topology as well as many conserved protein domains. Therefore, a conserved physiological function of P7 is assumed. In this Ph.D. thesis the underlying genomic and biochemical knowledge of four new SBF proteins were clarified. Also, the first phylogenetical relationships of the new protein family SBFDCP7 are presented in this study.

9 Literaturverzeichnis

- Ananthanarayanan M, Ng OC, Boyer JL, Suchy FJ. 1994. Characterization of cloned rat liver Na⁺-bile acid cotransporter using peptide and fusion protein antibodies. *Am J Physiol* 267:G637-G643.
- Ast G. 2004. How did alternative splicing evolve? *Nat Rev Genet* 5:773-782.
- Banerjee A, Swaan PW. 2006. Membrane topology of human ASBT (SLC10A2) determined by dual label epitope insertion scanning mutagenesis. New evidence for seven transmembrane domains. *Biochemistry* 45:943-953.
- Bateman A, Coin L, Durbin R, Finn RD, Hollich V, Griffiths-Jones S, Khanna A, Marshall M, Moxon S, Sonnhammer EL, Studholme DJ, Yeats C, Eddy SR. 2004. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res* 32:D138-D141.
- Blanco G, Mercer RW. 1998. Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. *Am J Physiol* 275:F633-F650.
- Blom N, Gammeltoft S, Brunak S. 1999. Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J Mol Biol* 294:1351-1362.
- Blom N, Sicheritz-Ponten T, Gupta R, Gammeltoft S, Brunak S. 2004. Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics* 4:1633-1649.
- Bobrowicz P, Wysocki R, Owsianik G, Goffeau A, Ulaszewski S. 1997. Isolation of three contiguous genes, *ACR1*, *ACR2* and *ACR3*, involved in resistance to arsenic compounds in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 13:819-828.
- Borst P, Elferink RO. 2002. Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu Rev Biochem* 71:537-592.
- Cattori V, Eckhardt U, Hagenbuch B. 1999. Molecular cloning and functional characterization of two alternatively spliced Ntcp isoforms from mouse liver1. *Biochim Biophys Acta* 1445:154-159.
- Chang EC, Kosman DJ, Willsky GR. 1989. Arsenic oxide-induced thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 171:6349-6352.
- Cohn MA, Rounds DJ, Karpen SJ, Ananthanarayanan M, Suchy FJ. 1995. Assignment of a rat liver Na⁺/bile acid cotransporter gene to chromosome 6q24. *Mamm Genome* 6:60.
- Craddock AL, Love MW, Daniel RW, Kirby LC, Walters HC, Wong MH, Dawson PA. 1998. Expression and transport properties of the human ileal and renal sodium-dependent bile acid transporter. *Am J Physiol* 274:G157-G169.
- Daniel H, Spanier B, Kottra G, Weitz D. 2006. From bacteria to man: archaic proton-dependent peptide transporters at work. *Physiology (Bethesda)* 21:93-102.
- Dawson PA, Haywood J, Craddock AL, Wilson M, Tietjen M, Kluckman K, Maeda N, Parks JS. 2003. Targeted deletion of the ileal bile acid transporter eliminates enterohepatic cycling of bile acids in mice. *J Biol Chem* 278:33920-33927.
- Dey S, Rosen BP. 1995. Dual mode of energy coupling by the oxyanion-translocating ArsB protein. *J Bacteriol* 177:385-389.

- Dreyer I, Horeau C, Lemaillot G, Zimmermann S, Bush DR, Rodríguez-Navarro A, Schachtman DP, Spalding E, Sentenac H, Gaber RF. 1999. Identification and characterization of plant transporters using heterologous expression systems. *J Exp Bot* 50:1073-1087.
- Gamba G. 2001. Alternative splicing and diversity of renal transporters. *Am J Physiol Renal Physiol* 281:F781-F794.
- Gardy JL, Spencer C, Wang K, Ester M, Tusnady GE, Simon I, Hua S, deFays K, Lambert C, Nakai K, Brinkman FS. 2003. PSORT-B: Improving protein subcellular localization prediction for Gram-negative bacteria. *Nucleic Acids Res* 31:3613-3617.
- Geer LY, Domrachev M, Lipman DJ, Bryant SH. 2002. CDART: protein homology by domain architecture. *Genome Res* 12:1619-1623.
- Geyer J, Godoy JR, Petzinger E. 2004. Identification of a sodium-dependent organic anion transporter from rat adrenal gland. *Biochem Biophys Res Commun* 316:300-306.
- Geyer J, Wilke T, Petzinger E. 2006. The solute carrier family SLC10: more than a family of bile acid transporters regarding function and phylogenetic relationships. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 372:413-431.
- Graveley BR. 2001. Alternative splicing: increasing diversity in the proteomic world. *Trends Genet* 17:100-107.
- Green RM, Ananthanarayanan M, Suchy FJ, Beier DR. 1998. Genetic mapping of the Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide to mouse chromosome 12. *Mamm Genome* 9:598.
- Hagenbuch B, Lubbert H, Stieger B, Meier PJ. 1990. Expression of the hepatocyte Na⁺/bile acid cotransporter in *Xenopus laevis* oocytes. *J Biol Chem* 265:5357-5360.
- Hagenbuch B, Stieger B, Foguet M, Lubbert H, Meier PJ. 1991. Functional expression cloning and characterization of the hepatocyte Na⁺/bile acid cotransport system. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:10629-10633.
- Hagenbuch B, Meier PJ. 1994. Molecular cloning, chromosomal localization, and functional characterization of a human liver Na⁺/bile acid cotransporter. *J Clin Invest* 93:1326-1331.
- Hagenbuch B, Meier PJ. 1996. Sinusoidal (basolateral) bile salt uptake systems of hepatocytes. *Semin Liver Dis* 16:129-136.
- Hagenbuch B, Dawson P. 2004. The sodium bile salt cotransport family SLC10. *Pflugers Arch* 447:566-570.
- Hata S, Wang P, Eftychiou N, Ananthanarayanan M, Batta A, Salen G, Pang KS, Wolkoff AW. 2003. Substrate specificities of rat oatp1 and ntcp: implications for hepatic organic anion uptake. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 285:G829-G839.
- Hediger MA, Romero MF, Peng JB, Rolfs A, Takanaga H, Bruford EA. 2004. The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteins. Introduction. *Pflugers Arch* 447:465-468.
- Julenius K, Molgaard A, Gupta R, Brunak S. 2005. Prediction, conservation analysis, and structural characterization of mammalian mucin-type O-glycosylation sites. *Glycobiology* 15:153-164.
- Kramer W, Wess G, Bewersdorf U, Corsiero D, Girbig F, Weyland C, Stengelin S, Enhnen A, Bock K, Kleine H, Le Dreau MA, Schafer HL. 1997. Topological photoaffinity labeling of the rabbit ileal Na⁺/bile-salt-cotransport system. *Eur J Biochem* 249:456-464.

- Kramer W, Stengelin S, Baringhaus KH, Enhnen A, Heuer H, Becker W, Corsiero D, Girbig F, Noll R, Weyland C. 1999. Substrate specificity of the ileal and the hepatic Na⁺/bile acid cotransporters of the rabbit. Transport studies with membrane vesicles and cell lines expressing the cloned transporters. *J Lipid Res* 40:1604-1617.
- Kramer W, Girbig F, Glombik H, Corsiero D, Stengelin S, Weyland C. 2001. Identification of a ligand-binding site in the Na⁺/bile acid cotransporting protein from rabbit ileum. *J Biol Chem* 276:36020-36027.
- Kramer W, Sauber K, Baringhaus KH, Kurz M, Stengelin S, Lange G, Corsiero D, Girbig F, König W, Weyland C. 2001. Identification of the bile acid-binding site of the ileal lipid-binding protein by photoaffinity labeling, matrix-assisted laser desorption ionization-mass spectrometry, and NMR structure. *J Biol Chem* 276:7291-7301.
- Krogh A, Larsson B, von Heijne G, Sonnhammer EL. 2001. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol* 305:567-580.
- Kullak-Ublick GA, Glasa J, Boker C, Oswald M, Grutzner U, Hagenbuch B, Stieger B, Meier PJ, Beuers U, Kramer W, Wess G, Paumgartner G. 1997. Chlorambucil-taurocholate is transported by bile acid carriers expressed in human hepatocellular carcinomas. *Gastroenterology* 113:1295-1305.
- Kullak-Ublick GA, Stieger B, Hagenbuch B, Meier PJ. 2000. Hepatic transport of bile salts. *Semin Liver Dis* 20:273-292.
- Kullak-Ublick GA, Stieger B, Meier PJ. 2004. Enterohepatic bile salt transporters in normal physiology and liver disease. *Gastroenterology* 126:322-342.
- Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W., et al. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409:860-921.
- Lazaridis KN, Tietz P, Wu T, Kip S, Dawson PA, LaRusso NF. 2000. Alternative splicing of the rat sodium/bile acid transporter changes its cellular localization and transport properties. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:11092-11097.
- Leslie EM, Haimeur A, Waalkes MP. 2004. Arsenic transport by the human multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1). Evidence that a tri-glutathione conjugate is required. *J Biol Chem* 279:32700-32708.
- Letunic I, Goodstadt L, Dickens NJ, Doerks T, Schultz J, Mott R, Ciccarelli F, Copley RR, Ponting CP, Bork P. 2002. Recent improvements to the SMART domain-based sequence annotation resource. *Nucleic Acids Res* 30:242-244.
- Lingrel JB, Kuntzweiler T. 1994. Na⁺,K⁺-ATPase. *J Biol Chem* 269:19659-19662.
- Little PF. 1982. Globin pseudogenes. *Cell* 28:683-684.
- Liu Z, Shen J, Carbrey JM, Mukhopadhyay R, Agre P, Rosen BP. 2002. Arsenite transport by mammalian aquaglyceroporins AQP7 and AQP9. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:6053-6058.
- Marchler-Bauer A, Anderson JB, Cherukuri PF, DeWeese-Scott C, Geer LY, Gwadz M, He S, Hurwitz DI, Jackson JD, Ke Z, Lanczycki CJ, Liebert CA, Liu C, Lu F, Marchler GH, Mullokandov M, Shoemaker BA, Simonyan V, Song JS, Thiessen PA, Yamashita RA, Yin JJ, Zhang D, Bryant SH. 2005. CDD: a Conserved Domain Database for protein classification. *Nucleic Acids Res* 33:D192-D196.

- Marger MD, Saier MH, Jr. 1993. A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyse uniport, symport and antiport. *Trends Biochem Sci* 18:13-20.
- Marin JJG, Romero MR, Vallejo M, Perez MJ, Briz O. 2005. Emerging interest in bile acid transporters in pathophysiology and pharmacology. *Med Hypotheses Res* 2:425-448.
- Meier PJ, Stieger B. 2002. Bile salt transporters. *Annu Rev Physiol* 64:635-661.
- Mitchell P. 1949. The osmotic barrier in bacteria. In: A.A. Miles and N.W. Pine (ed.). *The nature of the bacterial surface*. Blackwell, Oxford, United Kingdom. p. 55-75.
- Mukhopadhyay R, Shi J, Rosen BP. 2000. Purification and characterization of ACR2p, the *Saccharomyces cerevisiae* arsenate reductase. *J Biol Chem* 275:21149-21157.
- Nakai K, Horton P. 1999. PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. *Trends Biochem Sci* 24:34-36.
- Oelkers P, Kirby LC, Heubi JE, Dawson PA. 1997. Primary Bile Acid Malabsorption Caused by Mutations in the Ileal Sodium-dependent Bile Acid Transporter Gene (SLC10A2a). *J Clin Invest* 99:1880.
- Page RD. 1996. TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput Appl Biosci* 12:357-358.
- Rosen BP, Bhattacharjee H, Shi W. 1995. Mechanisms of metalloregulation of an anion-translocating ATPase. *J Bioenerg Biomembr* 27:85-91.
- Rosen BP. 1999. Families of arsenic transporters. *Trends Microbiol* 7:207-212.
- Rosen BP. 2002. Biochemistry of arsenic detoxification. *FEBS Lett* 529:86-92.
- Rossman TG, Wang Z. 1999. Expression cloning for arsenite-resistance resulted in isolation of tumor-suppressor fau cDNA: possible involvement of the ubiquitin system in arsenic carcinogenesis. *Carcinogenesis* 20:311-316.
- Saeki T, Matoba K, Furukawa H, Kirifuji K, Kanamoto R, Iwami K. 1999. Characterization, cDNA cloning, and functional expression of mouse ileal sodium-dependent bile acid transporter. *J Biochem (Tokyo)* 125:846-851.
- Saidijam M, Bettaney KE, Szakonyi G, Psakis G, Shibayama K, Suzuki S, Clough JL, Blessie V, Abu-Bakr A, Baumberg S, Mueller J, Hoyle CK, Palmer SL, Butaye P, Walravens K, Patching SG, O'reilly J, Rutherford NG, Bill RM, Roper DI, Phillips-Jones MK, Henderson PJ. 2005. Active membrane transport and receptor proteins from bacteria. *Biochem Soc Trans* 33:867-872.
- Saier MH, Jr. 2000. A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters. *Microbiol Mol Biol Rev* 64:354-411.
- Sato T, Kobayashi Y. 1998. The *ars* operon in the skin element of *Bacillus subtilis* confers resistance to arsenate and arsenite. *J Bacteriol* 180:1655-1661.
- Schroeder A, Eckhardt U, Stieger B, Tynes R, Schteingart CD, Hofmann AF, Meier PJ, Hagenbuch B. 1998. Substrate specificity of the rat liver Na⁺-bile salt cotransporter in *Xenopus laevis* oocytes and in CHO cells. *Am J Physiol* 274:G370-G375.

- Shneider BL, Dawson PA, Christie DM, Hardikar W, Wong MH, Suchy FJ. 1995. Cloning and molecular characterization of the ontogeny of a rat ileal sodium-dependent bile acid transporter. *J Clin Invest* 95:745-754.
- Shneider BL. 2001. Intestinal bile acid transport: biology, physiology, and pathophysiology. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 32:407-417.
- Stieger B, Hagenbuch B, Landmann L, Hochli M, Schroeder A, Meier PJ. 1994. *In situ* localization of the hepatocytic Na⁺/Taurocholate cotransporting polypeptide in rat liver. *Gastroenterology* 107:1781-1787.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22:4673-4680.
- Trauner M, Boyer JL. 2003. Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation. *Physiol Rev* 83:633-671.
- van Veen HW, Venema K, Bolhuis H, Oussenko I, Kok J, Poolman B, Driessen AJ, Konings WN. 1996. Multidrug resistance mediated by a bacterial homolog of the human multidrug transporter MDR1. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:10668-10672.
- Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA, et al. 2001. The sequence of the human genome. *Science* 291:1304-1351.
- Ward A, Sanderson NM, O'Reilly J, Rutherford NG, Poolman B, Henderson PJF. 2000. In: *Membrane Transport-A practical approach* (Baldwin SA, ed.). Blackwell, Oxford, United Kingdom. p. 141-166.
- Weinman SA. 1997. Electrogenicity of Na⁺-coupled bile acid transporters. *Yale J Biol Med* 70:331-340.
- Weinman SA, Carruth MW, Dawson PA. 1998. Bile acid uptake via the human apical sodium-bile acid cotransporter is electrogenic. *J Biol Chem* 273:34691-34695.
- Wilkins MR, Lindskog I, Gasteiger E, Bairoch A, Sanchez JC, Hochstrasser DF, Appel RD. 1997. Detailed peptide characterization using PEPTIDEMASS-a World-Wide-Web-accessible tool. *Electrophoresis* 18:403-408.
- Wong MH, Oelkers P, Craddock AL, Dawson PA. 1994. Expression cloning and characterization of the hamster ileal sodium-dependent bile acid transporter. *J Biol Chem* 269:1340-1347.
- Wong MH, Oelkers P, Dawson PA. 1995. Identification of a mutation in the ileal sodium-dependent bile acid transporter gene that abolishes transport activity. *J Biol Chem* 270:27228-27234.
- Wong MH, Rao PN, Pettenati MJ, Dawson PA. 1996. Localization of the ileal sodium-bile acid cotransporter gene (SLC10A2) to human chromosome 13q33. *Genomics* 33:538-540.
- Wysocki R, Bobrowicz P, Ulaszewski S. 1997. The *Saccharomyces cerevisiae* ACR3 gene encodes a putative membrane protein involved in arsenite transport. *J Biol Chem* 272:30061-30066.
- Yao A, Charlab R, Li P. 2006. Systematic identification of pseudogenes through whole genome expression evidence profiling. *Nucleic Acids Res*.

10. Anhang

10.1 Sequenzen

Human P7 Transkriptionsvariante 1, Isoform a

LOCUS DQ122860 1023 bp mRNA linear PRI 03-AUG-2005
 DEFINITION Homo sapiens P7 isoform a (P7) mRNA, complete cds.
 ACCESSION DQ122860
 VERSION DQ122860.1 GI:71480734
 KEYWORDS .
 SOURCE Homo sapiens (human)
 ORGANISM Homo sapiens
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
 Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini;
 Catarrhini; Hominidae; Homo.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 1023)
 AUTHORS Geyer,J., Godoy,J.R. and Petzinger,E.
 TITLE Cloning of P7 isoform a from human heart
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 1023)
 AUTHORS Geyer,J., Godoy,J.R. and Petzinger,E.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (11-JUL-2005) Institute of Pharmacology and Toxicology,
 Justus-Liebig-University of Giessen, Frankfurter Str. 107, Giessen
 35392, Germany
 FEATURES
 source Location/Qualifiers
 1..1023
 /organism="Homo sapiens"
 /mol_type="mRNA"
 /db_xref="taxon:9606"
 /chromosome="4q31.21"
 /tissue_type="heart"
 gene 1..1023
 /gene="P7"
 CDS 1..1023
 /gene="P7"
 /note="putative membrane transporter"
 /codon_start=1
 /product="P7 isoform a"
 /protein_id="AAZ32256.1"
 /db_xref="GI:71480735"
 /translation="MRLLEMRKDWFMVGIVLAIAGAKLEPSIGVNGGPLKPEITVSY
 IAVATIFFNSGLSLKTEELTSALVHLKLHLFIQIFTLAFFPATIWLFLQLLSITPINE
 WLLKGLQTVGCMPPPVSSAVILTKAVGGNEAAAFNSAFGSFLGIVITPLLLLLFLGS
 SSSVPFTSIFSQLFMTVVVPLIIGQIVRRYIKDWLERKKPPFGAISSSVLLMIYTTF
 CDTFSNPNIIDLKFSVLVLIIFIISIQLSFMLLTFIFSTRNNSGFTPADTVAIIFCST
 HKSLTLGIPMLKIVFAGHEHLSLISVPLLIYHPAQILLGSVLVPTIKSWMVSRQGVK
 LTRPTV"
 ORIGIN
 1 atgaggctgc tggagagaat gaggaaagac tggttcatgg tcggaatagt gctggcgatc
 61 gctggagcta aactggagcc gtccataggg gtgaatgggg gaccactgaa gccagaaata
 121 actgtatcct acattgctgt tgcaacaata ttctttaaca gtggactatc attgaaaaca
 181 gaggagctga ccagtgcctt ggtgcatcta aaactgcatc tttttattca gatctttact
 241 cttgcattct tcccagcaac aatatggcct tttcttcagc ttttatcaat cacacccatc
 301 aacgaatggc ttttaaaagg tttgcagaca gtaggttgca tgcctccgcc tgtgtcttct
 361 gcagtgattt taaccaaggc agttgggtgga aatgaggcag ctgcaatatt taattcagcc
 421 tttggaagtt ttttgggcat cgttataaca cccctgctcc tgctgctttt tcttggttca
 481 tcttcttctg tgcctttcac atctattttt tctcagcttt ttatgactgt tgtggttcct
 541 ctcattcattg gacagattgt ccgaagatac atcaaggatt ggcttgagag aaagaagcct

```

601 ccttttgggtg ctatcagcag cagtgtactc ctcatgatca tctacacaac attctgtgac
661 acgtttctcta acccaaatat tgacctggat aaattcagcc ttgttctcat actgttcata
721 atattttcta tccagctgag ttttatgctt ttaactttca tcttttcaac aaggaataat
781 tcgggttttca caccagcaga cacagtggct atcattttct gttctacaca caaatccctt
841 acattgggaa ttccgatgct gaagatcgtg tttgcaggcc atgagcatct ctctttaata
901 tctgtaccct tgctcatcta ccaccagct cagatccttc tgggaagtgt gttggtgcc
961 acaatcaagt cttggatggt atcaaggcag aagggaagtga agctgacaag gccgacagta
1021 taa

```

Human P7 Transkriptionsvariante 2, Isoform b

LOCUS DQ122861 805 bp mRNA linear PRI 03-AUG-2005

DEFINITION Homo sapiens P7 isoform b (P7) mRNA, complete cds.

ACCESSION DQ122861

VERSION DQ122861.1 GI:71480736

KEYWORDS .

SOURCE Homo sapiens (human)

ORGANISM Homo sapiens
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini;
Catarrhini; Hominidae; Homo.

REFERENCE 1 (bases 1 to 805)

AUTHORS Godoy,J.R., Geyer,J. and Petzinger,E.

TITLE Cloning of P7 isoform b from human heart

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 805)

AUTHORS Godoy,J.R., Geyer,J. and Petzinger,E.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (11-JUL-2005) Institute of Pharmacology and Toxicology,
Justus-Liebig-University of Giessen, Frankfurter Str. 107, Giessen
35392, Germany

FEATURES

source Location/Qualifiers

1..805

/organism="Homo sapiens"

/mol_type="mRNA"

/db_xref="taxon:9606"

/chromosome="4q31.21"

/tissue_type="heart"

gene 1..805

/gene="P7"

CDS 1..561

/gene="P7"

/note="putative membrane transporter"

/codon_start=1

/product="P7 isoform b"

/protein_id="AAZ32257.1"

/db_xref="GI:71480737"

/translation="MRLLEMRKDWFMVGIVLAIAGAKLEPSIGVNGGPLKPEITVSY
IAVATIFFNSGLSLKTEELTSALVHLKLHLFIQIFTLAFFPATIWFLQLLSITPINE
WLLKGLQTVGCMPPPVSSAVILTKAVGGNEAAIFNSAFGSFGLGIVITPLLLLLLFLGS
SSSVPFTSIFSQLFMTVVVPLIIGQE"

ORIGIN

```

1 atgaggctgc tggagagaat gaggaagac tggttcatgg tcggaatagt gctggcgatc
61 gctggagcta aactggagcc gtccataggg gtgaatgggg gaccactgaa gccagaaata
121 actgtatcct acattgctgt tgcaacaata ttctttaaca gtggactatc attgaaaaca
181 gaggagctga ccagtgcctt ggtgcatcta aaactgcac tttttattca gatctttact
241 cttgcattct tccagcaaac aatatggcct tttcttcagc ttttatcaat cacacccatc
301 aacgaatggc ttttaaaagg tttgcagaca gtaggttgca tgcctccgcc tgtgtcttct
361 gcagtgattt taaccaaggc agttggtgga aatgaggcag ctgcaatatt taattcagcc
421 tttggaagtt ttttgggcat cgttataaca cccctgctcc tgctgctttt tcttggttca
481 tcttcttctg tgcctttcac atctattttt tctcagcttt ttatgactgt tgtggttctc

```

```

541 ctcattcattg gacaggaata attcggggttt cacaccagca gacacagtgg ctatcatttt
601 ctgttctaca cacaaatccc ttacattggg aattccgatg ctgaagatcg tgtttgcagg
661 ccatgagcat ctctctttaa tatctgtacc cttgctcatc taccaccag ctcagatcct
721 tctgggaagt gtgttggtgc caacaatcaa gtcttgatg gtatcaaggc agaagggagt
781 gaagctgaca aggcgcagac tataa

```

Human P7 Transkriptionsvariante 3, Isoform c

LOCUS DQ871036 1134 bp mRNA linear PRI 29-AUG-2006

DEFINITION Homo sapiens P7 isoform c (P7) mRNA, complete cds.

ACCESSION DQ871036

VERSION DQ871036.1 GI:113196586

KEYWORDS .

SOURCE Homo sapiens (human)

ORGANISM Homo sapiens
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini;
Catarrhini; Hominidae; Homo.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1134)

AUTHORS Godoy,J.R., Geyer,J. and Petzinger,E.

TITLE Cloning of P7 isoform c from human heart

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 1134)

AUTHORS Godoy,J.R., Geyer,J. and Petzinger,E.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (28-JUL-2006) Institute of Pharmacology and Toxicology,
Justus-Liebig University, Frankfurter Str. 107, Giessen, Hessen
35392, Germany

FEATURES

source Location/Qualifiers
1..1134
/organism="Homo sapiens"
/mol_type="mRNA"
/db_xref="taxon:9606"
/chromosome="4"
/map="4q31.21"
/tissue_type="heart"

gene 1..1134
/gene="P7"

CDS 1..1077
/gene="P7"
/note="putative membrane transporter"
/codon_start=1
/product="P7 isoform c"
/protein_id="ABI31650.1"
/db_xref="GI:113196587"
/translation="MRLLEMRKDWFMVGIVLAIAGAKLEPSIGVNGGPKPEITVSY
IAVATIFFNSGLSLKTEELTSALVHLKLHLFIQIFTLAFFPATIWLFLQLLSITPINE
WLLKGLQTVGCMPPPVSSAVILTKAVGGNEAAAFNSAFGSFLGIVITPLLLLLLFLGS
SSSVPFTSIFSQLFMTVVVPLIIGQIVRRYIKDWLERKKPPFGAIISSSVLLMIYTTF
CDTFSPNIDLDKFSVLVILFIIFSIFLSFMLLTFFSTRNNSGFTPADTVAIIFCST
HKSLTLGIPMLKIVFAGHEHLSLISVPLLIYHPAQILLGSVLVPTIKSWMVSQRKKLL
QTRGPLANLNNPEGLEYLSIKFGH"

ORIGIN

```

1 atgaggctgc tggagagaat gaggaaagac tggttcatgg tcggaatagt gctggcgatc
61 gctggagcta aactggagcc gtccataggg gtgaatgggg gaccactgaa gccagaaata
121 actgtatcct acattgctgt tgcaacaata ttctttaaca gtggactatc attgaaaaca
181 gaggagctga ccagtgcctt ggtgcatcta aaactgcatc tttttattca gatctttact
241 cttgcattct tcccagcaac aatatggcct tttcttcagc ttttatcaat cacaccatc
301 aacgaatggc ttttaaaagg tttgcagaca gtaggttgca tgcctccgcc tgtgtcttct
361 gcagtgattt taaccaaggc agttgggtgga aatgaggcag ctgcaatatt taattcagcc
421 tttggaagtt ttttgggcat cgttataaca cccctgctcc tgctgctttt tcttggttca

```

```

481 tcttcttctg tgcctttcac atctatTTTT tctcagcttt ttatgactgt tgtggttcct
541 ctcatcattg gacagattgt ccgaagatac atcaaggatt ggcttgagag aaagaagcct
601 ccttttggtg ctatcagcag cagtgtactc ctcatgatca tctacacaac attctgtgac
661 acgttctcta acccaaatat tgacctggat aaattcagcc ttgttctcat actgttcata
721 atattttcta tccagctgag ttttatgctt ttaactttca tcttttcaac aaggaataat
781 tcgggtttca caccagcaga cacagtggct atcattttct gttctacaca caaatccctt
841 acattgggaa ttccgatgct gaagatcgtg tttgcaggcc atgagcatct ctctttaata
901 tctgtaccct tgctcatcta ccaccagct cagatccttc tgggaagtgt gttggtgcca
961 acaatcaagt cttggatggt atcaaggcag aagaaactac tccaaaccag ggggccactg
1021 gctaacttga ataatccaga aggcttgga tctctatcca tcaaatttgg gcattaaaat
1081 aaataccaag agtccatcct ccagggagtg aagctgacaa ggccgacagt ataa

```

Maus P7 Transkriptionsvariante 1, Isoform a

LOCUS AY825926 1023 bp mRNA linear ROD 06-DEC-2004

DEFINITION Mus musculus P7 isoform a (P7) mRNA, complete cds.

ACCESSION AY825926

VERSION AY825926.1 GI:56159724

KEYWORDS .

SOURCE Mus musculus (house mouse)

ORGANISM Mus musculus
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Glires; Rodentia;
Sciurognathi; Muroidea; Muridae; Murinae; Mus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1023)

AUTHORS Godoy,J.R., Geyer,J. and Petzinger,E.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (12-NOV-2004) Institute of Pharmacology and Toxicology,
Justus-Liebig-University of Giessen, Frankfurter Str. 107, Giessen
35392, Germany

FEATURES

source Location/Qualifiers
1..1023
/organism="Mus musculus"
/mol_type="mRNA"
/strain="C57BL/6J"
/db_xref="taxon:10090"
/chromosome="8"
/map="8C1"
/tissue_type="liver"

gene 1..1023
/gene="P7"

CDS 1..1023
/gene="P7"
/codon_start=1
/product="P7 isoform a"
/protein_id="AAV80709.1"
/db_xref="GI:56159725"
/translation="MRLLEARKKEWFMVGIVVAIGAALKLEPSVGVNGGPLKPEITVSY
IAVATIFFNSGLSLKTEELTSALVHLRLHLFIQIFTLAFFPAAIWLFLQLLSVTSINE
WLLKGLQTVGCMPPPVSSAVILTKAVGGNEAAAFNSAFGSFLGIVVTPVLLLLFLGS
SSSVPFTSIFSQLFMTVVVPLVIGQIVRRYIKDWLERKKPPFGVVSSSVLLMIYTTF
CDTFSNPNIDLKDFSLILILFIIIVSVQLSFMLLTFIFSTRNNSGFTPADTVAIIFCST
HKSLTLGIPMLKIVFAGHEHLSLISVPLLIYHPAQILLGSVLVPTIKSWMVSQRQGVK
LTRPTV"

ORIGIN

```

1 atgagactgc tggagagggc gaggaagaa tggttcatgg tcgggatagt ggtggcgatc
61 ggcgcgcgta agctcgagcc gtcggctcga gtgaacgggg gaccactgaa gccagagata
121 actgtgtcct acattgccgt cgcaacgata ttcttcaaca gtggactgtc attaaaaacg
181 gaggagctga ccagcgcact ggtgcacctg agactgcata ttttcatcca aatcttcaca
241 cttgccttct tcccagcagc aatatggctc tttcttcagc tcttatcagt cacatccatc
301 aacgagtggc ttttaaaagg tctgcagaca gtaggttgca tgccaccccc tgtgtcttct

```

```

361 gccgtgattt taaccaaggc agttgggtgga aatgaggcag ctgcatatt taattcagca
421 tttggaagtt ttttgggcat tggttgact ccggtgctcc tgctgctttt cctcggttca
481 tcctcttcgg tgcccttttac atccattttc tctcagctgt ttatgacggg ggtgggttct
541 cttgtcattg gacagatcgt ccgacgctac atcaaggact ggttgagag gaagaagcca
601 ccatttggtg tggtcagcag tagcgtgcta ctcatgatca tctacaccac cttctgtgac
661 accttctcca acccaaacat cgacctggac aagttcagcc tcctcctcat actgttcata
721 atagtctccg ttcagctgag cttcatgctt ctgactttca tcttctccac acggaataac
781 tcgggggttca caccagcaga cacagtggct atcatcttct gctccacaca caagtccttc
841 accttgggaa tcccaatgct gaagatagtg tttgcaggcc atgagcatct ctgctgata
901 tccgtgcctt tgctcatcta ccaccagct cagattctcc tgggaagtgt gttagtgcc
961 acaataaagt cttggatggt gtcaggcag aaggagtgga agctgacaag gccgacagt
1021 tga

```

Maus P7 Transkriptionsvariante 2, Isoform b

LOCUS AY825927 866 bp mRNA linear ROD 06-DEC-2004

DEFINITION Mus musculus P7 isoform b (P7) mRNA, complete cds.

ACCESSION AY825927

VERSION AY825927.1 GI:56159726

KEYWORDS .

SOURCE Mus musculus (house mouse)

ORGANISM Mus musculus
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Glires; Rodentia;
Sciurognathi; Muroidea; Muridae; Murinae; Mus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 866)

AUTHORS Godoy,J.R., Geyer,J. and Petzinger,E.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (12-NOV-2004) Institute of Pharmacology and Toxicology,
Justus-Liebig-University of Giessen, Frankfurter Str. 107, Giessen
35392, Germany

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..866
/organism="Mus musculus"
/mol_type="mRNA"
/strain="C57BL/6J"
/db_xref="taxon:10090"
/chromosome="8"
/map="8C1"
/tissue_type="liver"

gene 1..866
/gene="P7"

CDS 1..312
/gene="P7"
/codon_start=1
/product="P7 isoform b"
/protein_id="AAV80710.1"
/db_xref="GI:56159727"
/translation="MRLLEARKWFMVGIVVAIGAAKLEPSVGVNGGADQRTGAPET
ASFHPNLHTCLLPSSNMALSSALISHIHQRVAFKRSADSR LHATPCVFCRDFNQGSWW
K"

ORIGIN

```

1 atgagactgc tggagagggc gaggaagaa tggttcatgg tcgggatagt ggtggcgatc
61 ggcgccgcta agctcgagcc gtcggtcgga gtgaacgggg gagctgacca gcgcactggt
121 gcacctgaga ctgcatcttt tcatccaaat cttcacactt gccttcttcc cagcagcaat
181 atggctcttt cttcagctct tatcagtcac atccatcaac gaggggcttt taaaagggtct
241 gcagacagta ggttgcatgc caccctctgt gtcttctgcc gtgattttaa ccaaggcagt
301 tgggtggaaat gaggcagctg cgatatttaa ttcagcattt ggaagttttt tgggcattgt
361 tgtgactccg gtgctcctgc tgcttttctt cgggttcattc tcttcggtgc cttttacatc
421 cattttctct cagctgttta tgacggtggg ggttcctctt gtcattggac agatcgtccg
481 acgctacatc aaggactggc tggagaggaa gaagccacca tttggtgtgg tcagcagtag

```

```

541 cgtgctactc atgatcatct acaccacctt ctgtgacacc ttctccaacc caaacatcga
601 cctggacaag ttcagcctca tcctcatact gttcataata gtctccgttc agctgagctt
661 catgcttctg acttttcatct tctccacacg gaatcccaat gctgaagata gtgtttgcag
721 gccatgagca tctctcgctg atatccgtgc ccttgtcat ctaccaccca gctcagattc
781 tcctgggaag tgtgttagtg ccaacaataa agtcttggat ggtgtccagg cagaagggag
841 tgaagctgac aaggccgaca gtgtga

```

Maus P7 Transkriptionsvariante 3, Isoform c

LOCUS AY825928 939 bp mRNA linear ROD 06-DEC-2004

DEFINITION Mus musculus P7 isoform c (P7) mRNA, complete cds.

ACCESSION AY825928

VERSION AY825928.1 GI:56159728

KEYWORDS .

SOURCE Mus musculus (house mouse)

ORGANISM Mus musculus

Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Glires; Rodentia; Sciurognathi; Muroidea; Muridae; Murinae; Mus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 939)

AUTHORS Godoy,J.R., Geyer,J. and Petzinger,E.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (12-NOV-2004) Institute of Pharmacology and Toxicology, Justus-Liebig-University of Giessen, Frankfurter Str. 107, Giessen 35392, Germany

FEATURES

Location/Qualifiers

source 1..939

/organism="Mus musculus"

/mol_type="mRNA"

/strain="C57BL/6J"

/db_xref="taxon:10090"

/chromosome="8"

/map="8C1"

/tissue_type="liver"

gene 1..939

/gene="P7"

CDS 1..939

/gene="P7"

/codon_start=1

/product="P7 isoform c"

/protein_id="AAV80711.1"

/db_xref="GI:56159729"

/translation="MRLLEARKKEWFMVGIVVAIGAALKLEPSVGVNGGPLKPEITVSY IAVATIFFNSGLSLKTEELTSALVHLRLHLFIQIFTLAFFPAAIWFLQLLSVTSINE WLLKGLQTVGCMPPPVSSAVILTKAVGGNEAAAFNSAFGSFLGIVVTPVLLLLFIVR RYIKDWLERKKPPFGVVSSSVLLMIYTTFCDTFSNPNIIDLKFSLLILFIIVSVQL SFMLLTFFIFSTRNNSGFTPADTVAIIFCSTHKSLLTGIPMLKIVFAGHEHLSLISVPL LIYHPAQILLGSVLVPTIKSWMVSRQKGVKLTRPTV"

ORIGIN

```

1 atgagactgc tggagagggc gaggaagaa tggttcatgg tcgggatagt ggtggcgatc
61 ggcgccgcta agctcgagcc gtcggtcgga gtgaacgggg gaccactgaa gccagagata
121 actgtgtcct acattgccgt cgcaacgata ttcttcaaca gtggactgtc attaaaaacg
181 gaggagctga ccagcgcact ggtgcacctg agactgcatc ttttcatcca aatcttcaca
241 cttgccttct tcccagcagc aatatggctc tttcttcagc tcttatcagt cacatccatc
301 aacgagtggc ttttaaaagg tctgcagaca gtaggttgca tgccaccccc tgtgtcttct
361 gccgtgattt taaccaaggc agttggtgga aatgaggcag ctgcgatatt taattcagca
421 tttggaagtt ttttgggcat tgttgtgact ccggtgctcc tgctgctttt catcgtccga
481 cgctacatca aggactggct ggagaggaag aagccaccat ttggtgtggt cagcagtagc
541 gtgctactca tgatcatcta caccaccttc tgtgacacct tctccaaccc aaacatcgac
601 ctggacaagt tcagcctcat cctcatactg ttcataatag tctccgttca gctgagcttc
661 atgcttctga ctttcatctt ctccacacgg aataactcgg ggttcacacc agcagacaca

```

```

721 gtggctatca tcttctgctc cacacacaag tccctcacct tgggaatccc aatgctgaag
781 atagtgtttg caggccatga gcatctctcg ctgatatccg tgcccttgct catctaccac
841 ccagctcaga ttctcctggg aagtgtgtta gtgccaacaa taaagtcttg gatggtgtcc
901 aggcagaagg gagtgaagct gacaaggccg acagtgtga

```

Ratte P7

LOCUS AY825929 1023 bp mRNA linear ROD 06-DEC-2004

DEFINITION *Rattus norvegicus* P7 (P7) mRNA, complete cds.

ACCESSION AY825929

VERSION AY825929.1 GI:56159730

KEYWORDS .

SOURCE *Rattus norvegicus* (Norway rat)

ORGANISM *Rattus norvegicus*
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Glires; Rodentia;
Sciurognathi; Muroidea; Muridae; Murinae; *Rattus*.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1023)

AUTHORS Geyer, J., Godoy, J.R. and Petzinger, E.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (12-NOV-2004) Institute of Pharmacology and Toxicology,
Justus-Liebig-University of Giessen, Frankfurter Str. 107, Giessen
35392, Germany

FEATURES

Location/Qualifiers

source 1..1023
/organism="Rattus norvegicus"
/mol_type="mRNA"
/strain="Wistar"
/db_xref="taxon:10116"
/chromosome="19"
/map="19q11"
/tissue_type="colon"

gene 1..1023
/gene="P7"

CDS 1..1023
/gene="P7"
/codon_start=1
/product="P7"
/protein_id="AAV80712.1"
/db_xref="GI:56159731"
/translation="MRLLEVRKEWFMVGIVVAIGA AKLEPSVGVNGGPLKPEITVS
YIAVATIFFNSGLSLKTEELTSALVHLKLHLFIQVFTLAFPTTIWFLQLLSVTSINE
WLLKGLQTVGCMPPPVSSAVILTKAVGGNEAAAI FNSAFGSFLGIVVTPVLLLLFLGS
SSSVPFTSIFSQLFMTVVVPLVIGQIVRRYIKDWLERKKPFGVSSSVLLMIYTTF
CDTFNPNIDLKFSLLILFIIVSIQLSFMLLTFVVFSTRNNSGFTPADTVAIIFCST
HKSLTLGIPMLKIVFAGHEHLSLISLPLLIYHPAQILLGSVLVPTIKSWMVSRQKGVK
LTRPTV"

ORIGIN

```

1 atgaggctgc tggagagggg gaggaagaa tggttcatgg tgggatagt ggtggcgatc
61 ggcgccgcta agctggagcc gtcggtcgga gtgaacgggg gaccactgaa gccagagata
121 actgtgtcct acattgctgt tgcaacgata ttcttcaaca gtggactgtc attgaaaaca
181 gaggagctga ccagcgcact ggtgcacttg aagctgcata tcttcatcca ggtcttcacg
241 cttgccttct tccaacaac aatatggctc tttcttcagc tcctatcagt cactccatc
301 aacgagtggc ttttaaaagg tttgcagaca gtaggctgca tgcctcccc tgtgtcttct
361 gctgtgattc taaccaaggc agtcggagga aatgaggcag ctgcaatatt taattcagca
421 tttggaagtt ttttgggcat tggtgtgact ccagtgtctc tgctgctttt cctcggtcca
481 tcctcttcg tgctttttac atcgattttc tctcagctct ttatgacggg ggtgggtcct
541 cttgttatcg gacagatcgt ccgaagatac atcaaggact ggctcgaaag gaagaaaccg
601 ctttcggcg tggtcagcag cagcgtgctt ctcatgatca tctacaccac cttctgtgac
661 actttctcca acccaaacat tgacctggac aaattcagcc tcactctcat actgttcata
721 atagtctcca ttcaactgag cttcatgctt ctgactttcg tcttctccac acggaataac

```



```

781 tcgggggttca caccagcaga cacagtggct atcatcttct gctctacaca caagtccttc
841 accttgggga tcccgatgct gaagatagtg tttgccggcc atgagcatct ctcgctgata
901 tccctgccct tgcttatcta ccacccggct cagatcctcc tgggaagtgt gttggtgcca
961 actataaagt cttggatggt gtcgaggcag aagggagtga agctgacgag gccaacagtg
1021 tga

```

Frosch P7 Transkript 1

```

LOCUS      DQ122862                1032 bp    mRNA    linear    VRT 03-AUG-2005
DEFINITION Xenopus laevis P7 (P7) mRNA, complete cds.
ACCESSION  DQ122862
VERSION    DQ122862.1  GI:71480738
KEYWORDS   .
SOURCE     Xenopus laevis (African clawed frog)
  ORGANISM Xenopus laevis
            Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
            Amphibia; Batrachia; Anura; Mesobatrachia; Pipoidae; Pipidae;
            Xenopodinae; Xenopus; Xenopus.
REFERENCE  1 (bases 1 to 1032)
  AUTHORS  Godoy,J.R., Geyer,J. and Petzinger,E.
  TITLE    Cloning of frog P7 from small intestine
  JOURNAL  Unpublished
REFERENCE  2 (bases 1 to 1032)
  AUTHORS  Godoy,J.R., Geyer,J. and Petzinger,E.
  TITLE    Direct Submission
  JOURNAL  Submitted (11-JUL-2005) Institute of Pharmacology and Toxicology,
            Justus-Liebig-University of Giessen, Frankfurter Str. 107, Giessen
            35392, Germany
FEATURES   Location/Qualifiers
  source    1..1032
            /organism="Xenopus laevis"
            /mol_type="mRNA"
            /db_xref="taxon:8355"
            /tissue_type="small intestine"
  gene      1..1032
            /gene="P7"
  CDS       1..1032
            /gene="P7"
            /note="putative membrane transporter"
            /codon_start=1
            /product="P7"
            /protein_id="AAZ32258.1"
            /db_xref="GI:71480739"
            /translation="MGLLELRKEWFIVGIILVIAAAKLEPTVGKGGPLKPEITITY
            IAVSAIFNSGLSLKTEELTNALMHVKLHLFVQLFTLVFFPTAIWLFLQVLSLTPINE
            WLLKGLQTVSCMPPPVSSAVILTKAVGGNEAAIFNSAFGSFLGIVVTPLLLLLFLGS
            SSSVPFTSIFSQLFMTVVVPLIIGQIVRRYIKDWLERKKPPFGAISSCVLLMIYTTF
            CDTFSNPNIIDLDTFSLVVIVFIIFFIQLAFMLLTFLFSTSKNSGFTPADTVAIVFCST
            HKSLTLGIPMLKIVFVGYEHLISVPLLIYHPAQILLGSVLVPTIKSWMLSRQKALK
            LTRQPKIPL"
ORIGIN
  1 atgggcctgc tggagagact gaggaaagaa tggtttattg tcggcattat cctggttatc
  61 gcagctgcta aactggaacc taccgtggga gtgaaagggg ggccattgaa gccagaaatt
  121 accatcacgt atattgcagt gtctgtcata ttctttaaca gtggactctc cttaaaaaca
  181 gaggaaactga caaatgcatt gatgcatgta aagcttcacg tttttgtcca gctttttaca
  241 ctcgtcttct tccccacagc aatatggctt ttccttcaag ttctgtctct tacaccata
  301 aatgaatggc tgttgaaggg tttgcagaca gtaagctgta tgcctcctcc tgtttcatca
  361 gctgtgatct tgaccaaagc tgtcggtggt aatgaggctg ctgccatttt caactctgca
  421 tttggaagct tcttgggcat tgttgtaaca ccactgctgc tgctcctctt tctgggatct
  481 tcctcttcag taccttttac ctccatattc tctcagctgt ttatgactgt cgttggtcca
  541 cttatcattg gtcagattgt acgacgctac atcaaggact ggctggaaag gaagaagcca

```

```

601 ccatttgggg ccacagcag ctgtgtcctt ctaatgatta tctacacaac attctgtgac
661 acatttctcca acccaaacat tgacctagac actttcagtt tgggtgttat tgtattttatc
721 atatttttta tccagttggc attcatgctt ttaacattcc tcttttctac aagcaaaaac
781 agtgggtttta ctccagccga cacggtggca atagtatttt gctcaacaca caagtccttc
841 accctaggaa tccctatgct gaagatcgtg tttgtaggat atgaacacct gtcattaata
901 tccgttccgc tgctaatac caccgggct caaatccttc tcggaagtgt attagtagca
961 acaataaagt catggatgct ctccaggcag aaggccctga aattaacaag gcagccgaag
1021 attccattat aa

```

Frosch P7 Transkript 2

```

LOCUS      DQ148474                1032 bp    mRNA    linear    VRT 22-AUG-2005
DEFINITION Xenopus laevis P7 (P7) mRNA, complete cds.
ACCESSION  DQ148474
VERSION    DQ148474.1  GI:73486801
KEYWORDS   .
SOURCE     Xenopus laevis (African clawed frog)
  ORGANISM Xenopus laevis
            Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
            Amphibia; Batrachia; Anura; Mesobatrachia; Pipidea; Pipidae;
            Xenopodinae; Xenopus; Xenopus.
REFERENCE  1 (bases 1 to 1032)
  AUTHORS  Godoy,J.R., Geyer,J. and Petzinger,E.
  TITLE    Cloning and functional characterization of xP7
  JOURNAL  Unpublished
REFERENCE  2 (bases 1 to 1032)
  AUTHORS  Godoy,J.R., Geyer,J. and Petzinger,E.
  TITLE    Direct Submission
  JOURNAL  Submitted (28-JUL-2005) Institute For Pharmacology and Toxicology,
            Justus-Liebig-University, Frankfurter Str. 107, Giessen 35392,
            Germany
FEATURES   Location/Qualifiers
    source   1..1032
             /organism="Xenopus laevis"
             /mol_type="mRNA"
             /db_xref="taxon:8355"
             /tissue_type="small intestine"
    gene     1..1032
             /gene="P7"
    CDS      1..1032
             /gene="P7"
             /codon_start=1
             /product="P7"
             /protein_id="AAZ76553.1"
             /db_xref="GI:73486802"
             /translation="MGLLERLRKEWFIIGIILVIVAACLEPTIGEGKGPLKPEITITY
             IAVSAIFFNSGLSLKTEELTNALMHVKLHLFVQLFTLVFFPTAIWIFLQVLSLTPINE
             WLLKGLQTVSCMPPPVSSAVILTKAVGGNEAAAFNSAFGSFLGIVVTPLLLLLLFLGS
             SSSVPFTSIFSQLFMTVVVPLIIGQIVRRYIKDWLERKKPPFGAISSCVLLMIYYTTF
             CDTFSNPNIIDLDTFSLVVIVFIIFFIQLAFMLLTFLFSTSKNSGFTPADTVAIVFCST
             HKSLTLGIPMLKIVFAGYEHLSLISVPLLIYHPAQILLGSVLVPTIKSWMLSRRKALK
             LTRQPKIPL"
ORIGIN
    1 atgggcctgc tggagagact gaggaagaa tggtttatca tcgggattat tctggttatc
    61 gtagcggcta aactggaacc taccatagga gagaaagggg ggccactgaa gccagaaatt
    121 accatcacgt atattgcggt gtctgtcata ttctttaaca gtggactctc attaaaaaca
    181 gaggaactga caaacgcgtt gatgcatgta aagcttcacc tatttgtcca gctttttaca
    241 ctcgctcttct ttcccacagc aatatggatt ttccttcaag ttctgtctct tacaccata
    301 aatgaatggc ttttgaaggg tttgcagaca gtaagctgta tgctcctcc tgtttcatca
    361 gctgtgatct tgaccaaagc cgttgggtgg aatgaggctg ctgctatatt caactctgca
    421 tttggaagtt tcttgggcat cgttgtaacg ccactgctgc tgctcctctt tctgggatca

```

```

481 tcctcttcag taccctttac ctccatattc tctcagctgt ttatgacagt tgttgttcca
541 cttattattg gtcagatagt acggcgctac atcaaagact ggctggaaag gaagaagcca
601 ccgtttggtg ccatcagcag ctgtgtcctg ctaatgatta tctacacaac attctgtgac
661 acattctcta acccaaacat tgacctagac acttttcagct tgggtgttat agtattttatc
721 atatttttta tccagttggc attcatgctt ttaacattcc tcttttctac aagcaaaaac
781 agtggcttta cccagccga cacagtggca atagtatttt gttcaacaca caagtccttc
841 acccttgga tccctatgct gaagatcgtg ttgacaggat acgaacatct ctcactaata
901 tcagttcctc tgctaatac caccctcgct caaatccttc tgggaagtgt attagtacca
961 acaatcaa atggatgct atcaaggcgg aaggcgtga aactaacaag gcagccgaag
1021 attccattat aa

```

10.2 Transmembrandomäne-Topologie

Vergleich der Transmembrantopologie der P7-Proteine von Bakterien nach Voraussage des Programms HMMTOP. Die Orientierung des N- (N_T) und C-Terminus (C_T) ist gezeigt.

Spezies	N_T	TMD1	TMD2	TMD3	TMD4	TMD5	TMD6	TMD7	TMD8	TMD9	TMD10	C_T
<i>S. flexneri</i>	in	6-23	30-48	69-88	97-116	129-151	164-181	202-220	229-251	272-289	294-311	in
<i>S. enterica</i>	in	6-24	29-48	69-88	97-116	129-151	164-181	202-220	229-251	264-283	288-310	in
<i>E. coli</i>	in	6-23	30-48	69-88	97-116	129-151	164-181	202-220	229-251	272-289	294-311	in
<i>E. carotovora</i>	in	12-28	33-50	71-88	93-110	131-154	163-181	206-223	232-254	279-302	-	out
<i>Y. pestis</i>	in	12-28	39-56	69-86	95-112	137-154	163-181	206-223	232-254	279-302	-	out

10.3 Weitere P7-verwandte Sequenzen von Wirbeltieren und Bakterien

	Spezies	Nucleotid (Accession No.)	cDNA (bp)	Protein (Accession No.)	Länge (aa)
Eukaryonten	<i>Bos taurus</i>	XM_865472	993	XP_870565	330
	<i>Pan troglodytes</i>	XM_526698	1464	XP_526698	487
	<i>Danio rerio</i>	XM_678034	1089	XP_683126	325
	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	CAAE01014678	996	CAG02203	332
	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	XM_781529	1263	XP_786622	420
	Bakterien	<i>Ralstonia eutropha</i>	NC_007347	1026	YP_294811
<i>Pseudomonas syringae</i>		NC_005773	1029	YP_276752	342
<i>Ralstonia metallidurans</i>		NZ_AAAI03000001	1092	ZP_00594571	363
<i>Cytophaga hutchinsonii</i>		NZ_AABD03000002	1029	ZP_00310257	342
<i>Yersinia intermedia</i>		NZ_AALF01000055	1026	ZP_00832312	341
<i>Burkholderia pseudomallei</i>		NC_007434	1149	YP_331946	382
<i>Ralstonia solanacearum</i>		AL646070	1077	CAD16245	358
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>		NC_002935	969	NP_940663	322
<i>Brucella suis</i>		AE014291	966	AAN29984	321
<i>Propionibacterium acnes</i>		NC_006085	987	YP_056232	328

10.4 Alignment der SBFDCP7-Familie

```

M_musculus      1 -----
R_norvegicus    1 -----
H_sapiens       1 -----
C_familiaris    1 -----
X_laevis        1 -----
G_gallus        1 -----
S_cerevisiae    1 -----
K_lactis        1 -----
D_hansenii      1 -----
P_aeruginosa    1 -----
P_putida        1 -----
B_ambifaria     1 -----
B_abortus       1 -----
S_flexneri      1 -----
E_coli          1 -----
S_enterica      1 -----
E_carotovora    1 -----
Y_pestis        1 -----
C_crescentus    1 -----
C_diphtheriae   1 -----
P_acnes         1 -----
R_solanacearum  1 -----
R_eutropha      1 -----
P_syringae      1 -----
A_thaliana      1 MAIASTLASTQNPFCLRQPPSPGNRSVFRRCQDPCGRRWISRSIRACQPSDKVSGQFPDFMYSSMLI
O_sativa        1 -----MVTTHH--LCLLR-STVLSVPVRLRAPPPHRLPTASASASS----YHGPTHRLRLRLPLRAA

```

```

M_musculus      1 -----MRLLERAR-----KEWFMVGIVVAAGAAKLEPSVGVNGGGLKPEITV
R_norvegicus    1 -----MRLLERAR-----KEWFMVGIVVAAGAAKLEPSVGVNGGGLKPEITV
H_sapiens       1 -----MRLLERAR-----KDWFMVGIVLAAGAAKLEPSIGVNGGGLKPEITV
C_familiaris    1 -----MRLLERAR-----KEWFMIGIVLAAGAAKLEPSVGVNGGGLKPEITV
X_laevis        1 -----MGLLERAR-----KEWFIVGIILVAAAKLEPTVGVKGGGLKPEITI
G_gallus        1 -----MGLLERAR-----KEWFIAGIALVAAARLEPAVGVKGGGLKPEITI
S_cerevisiae    8 -----IRKIWAHSVTEFK-----SQWFFICLAILIVARFAPNFARDGGLIKQYSI
K_lactis        18 SVESEQRKNTSPFKHRLSVIYNHKITQYII-----SQWFFIGLAIFIVLARFFNFARSGLIRGQYSI
D_hansenii      8 KET-----KAYKVLSSVVSFI-----SQWFFELGAFVATAHSYPEFAKQGGTIRAEYSI
P_aeruginosa    1 -----MSRPR-F-----LPDNFTLALIIATVLLATFLPCSGQT---AVVFEWV
P_putida        1 -----MDTVMKYLR-M-----LFDNFTLALLGVVLIATVLPSCGDG---AVYFGWL
B_ambifaria     1 -----MARPR-F-----LPDNFTLALVGTVVLASLPCRGPA---AHAFNWA
B_abortus       1 -----MR-F-----LPDKFTTILIIATIIIFASVLEVRGEF---AVWFALA
S_flexneri      1 -----MKLFR-----ILDPFTTILITVLLASFFPARGDF---VPFFENL
E_coli          1 -----MKLFR-----ILDPFTTILITVLLASFFPARGDF---VPFFENL
S_enterica      1 -----MKLFR-----ILDPFTTILITVLLASFFPAEGSF---VPVVEGI
E_carotovora    1 -----MGWLQR-----RIDKFLVLILVVVTASILPAECTV---KVFFEYL
Y_pestis        1 -----MSWLQR-----QIDKFLVLILVVIIASTPCEGET---KVWFERL
C_crescentus    1 -----MPGGTRILSMGFKSLDK-----KIEPVVIALFGMVVLASVLPVRCAA---AEGLSVI
C_diphtheriae   1 -----MGRIK-----NLDPLVLIILAVIIAIIAPARGAF---AHNFSLA
P_acnes         1 -----MSSANPRRT-----PIDGFVLAIVVTAIGSMLEATGSA---VPVVKHG
R_solanacearum  1 -----MACNSGHPLIRSA PWRRKH KIPFLSRIDGFTRAMLVMLLALLPESLCASAG-PLHLDIV
R_eutropha      1 -----MSSMFTKLKK-----YDLIDGFVLIIMLTALGIALAPEFGSSRG-PLHLGTI
P_syringae      1 -----MQSLKHFKRVA-----TDWFLWGMVLATVLAFFPRFCATGG-SMHA EYV
A_thaliana      71 PSSCGEWNRIHLGGDGGISASAQRIFYGKELLSFASDNFLPLALVSGVGLGFANETLGCCL---ADKYSF
O_sativa        58 AAAAGGASPDGADGAKRPAPAAASSSLGAALVGFARSNFLPLALIAGLALALMDPTLGCCL---AHKYSF

```

M_musculus	43	SYTAVATIFFNSGLSKTEELTSALVHLRLHLFIQFTLAFPPAAIWFLQLSVTS---	INEWLLKGLQ
R_norvegicus	43	SYTAVATIFFNSGLSKTEELTSALVHLRLHLFIQFTLAFPPATTIWFLQLSVTS---	INEWLLKGLQ
H_sapiens	43	SYTAVATIFFNSGLSKTEELTSALVHLRLHLFIQFTLAFPPATTIWFLQLSITP---	INEWLLKGLQ
C_familiaris	43	SYTAVATIFFNSGLSKTEELTSALVHLRLHLFIQFTLAFPPATTIWFLQLSITP---	INEWLLKGLQ
X_laevis	43	TYTAVSAIFNSGLSKTEELTNALMHVRLHLFVQFTLVFFPTAIWFLQVLSITP---	INEWLLKGLQ
G_gallus	43	TYTAVSAIFNSGLSKTEELTSALMHVRLHLFVQFTLVFFPTAIWFLQVLSITP---	INEWLLKGLQ
S_cerevisiae	56	GYGCVAWIFLQSGLGKSRSLMANMLNWRRAHATILVLSFLTSSIVYGFCACAKAANDPKDDDWLIGLI	
K_lactis	82	GYGAVIVIFLQSGLSMSTKKLLVMGNWRAHLVVLVISFLVTSSIMYGCACAKAANDDKDDDWLIGLI	
D_hansenii	59	QYGAVAVIFLISGLSMSTALLRVNLLNWRRAHFTVLSTSFLLTSSIIYGLACGIKAANDPSDEWLLAGMI	
P_aeruginosa	39	TNIGIGLLFFLHCAKLSRQAITAGMTHWRHLHLVFACTFVVF----	LLGLALKPALSPMTPELYIGIL
P_putida	43	TNLAIGLLFFLHCAKLSREAITAGAGHWRHLHLVFSCTFVLFP----	LLGLAFKPLFVPLVGNELYLIGIL
B_ambifaria	39	TNTAVGLLFFLHCAKLSREAVVAGATHWRHLHAVLLSTFALFP----	LLGLAKPVLQPLVPTPLYAGVL
B_abortus	36	TKIYVGLLFFLHCAKLSREAVIAGITHWKLHVTVLSTFVLFP----	ILGLAGWAIPLGSLQSPFYTGIL
S_flexneri	38	TTAAIALLFFMHCAKLSREAITAGGGHWRHLHLVLCSTFVLFP----	ILGVLFWWKPVNVDPMILYSGFL
E_coli	38	TTAAIALLFFMHCAKLSREAITAGGGHWRHLHLVLCSTFVLFP----	ILGVLFWWKPVNVDPMILYSGFL
S_enterica	38	TTAAIALLFFMHCAKLSREAITAGGGHWRHLHLVLCSTFVLFP----	VLGVLFWWAPVNVDPMILYSGFL
E_carotovora	40	TTAAIALLFFMHCAKLSREAITTGMGHWRHLHLVVFSTFVLFP----	LLGIGMSLLSPVVDPTPLYGFL
Y_pestis	40	TTAAIALLFFMHCAKLSREAITTGMGHWRHLHLVVFSTFVLFP----	LLGVGMNVLPVNVDPTPLYGFL
C_crescentus	52	VKLAIALLFFLHCAKLSREAVVAGVTHWRHLHLTILAFSTFVVF----	VIGLVASKLG--VLSSTLAAGML
C_diphtheriae	39	TNLAIGLLFFLYCARLSTHEALEGLKNWKLHLTILAFSTFVVF----	LLGIALKPLE-MVLSSTLYGIL
P_acnes	43	VTVLIFILFFLYCARLEPRETDGLKNWKLQGAITASTFVVF----	LLGLAMRALVPWAPSTLYVGML
R_solanacearum	61	TVLGVSLVFFLHCAALSREKIVEGARNWRHLHLFVQSTFVLFP----	LLGAAILVACKPFPAPALLGVF
R_eutropha	48	TSLGVALVFFLHCAALSRLDKLVSGARHWRHLHVFOVFTYVVF----	VVGLLMLSLRNTPADLLGVF
P_syringae	45	IKVGVFVFFLHGVNLSSEQIKKGLTNWRHLHVMIQVFTFVVF----	LLWLACQKLLDSYPALLMGFL
A_thaliana	137	TKISTCGIFLISGLTTRTEAIGAAVKGWPGLGLELISILLTF-----	SFSRLIMLVQLQPRELVGLG
O_sativa	124	SKYSTFGIFLISGLTTRTKELGALEAWPAGLFGASILLTF-----	FLAQFIMQIKFFPHEFTGLA

M_musculus	110	TVGCMPPPVSSAVILTKAVGGNEAAAIFFNSAFGSLGIVVTPVLLLLFLGSSSSVP-----	
R_norvegicus	110	TVGCMPPPVSSAVILTKAVGGNEAAAIFFNSAFGSLGIVVTPVLLLLFLGSSSSVP-----	
H_sapiens	110	TVGCMPPPVSSAVILTKAVGGNEAAAIFFNSAFGSLGIVVTPVLLLLFLGSSSSVP-----	
C_familiaris	110	TVGCMPPPVSSAVILTKAVGGNEAAAIFFNSAFGSLGIIITPILLLLFLGSSSSVP-----	
X_laevis	110	TVGCMPPPVSSAVILTKAVGGNEAAAIFFNSAFGSLGIVVTPVLLLLFLGSSSSVP-----	
G_gallus	110	TVGCMPPPVSSAVILTKAVGGNEAAAIFFNSAFGSL-----	LGSSSSVP-----
S_cerevisiae	126	LTATCPTTVASNVIMTINAGGNSLLCVCEVFIGNLLGAFITPALVQFTNRAPFAYGNPAT----	GNGIG
K_lactis	152	VTATCPTTVSSNVVMTTKADGNALLCLCEVFIGNVLGAFITPALVQMYTSSGPMVFGNPAT----	DTSVQ
D_hansenii	129	VTHACPTTVSSNVVMTKQAHGNDVLTLEVSIGNLLGAFVTPALVQMYTVG-TWEFANPTHQSSGDTTIQ	
P_aeruginosa	105	FLCALPATVQSSIAFTSLARGNVPAAVCSASVSSLLGVFLTPILLVKLILG-AECETGNALD-----	
P_putida	109	YLCALPATVQSAIAFTSLARGNVPAATCSAAASSLLGIFLTPILLVMLILG-AGDGTGSGLD-----	
B_ambifaria	105	FLCLPSTVQSSIAFTSLAKGNVPAAVCAASASSLLGIFVTPALLGLMITSQSAASASPWS-----	
B_abortus	102	YLCVLPSTVQSSIAFTSMARGNVSAAVVSASASNLGCMFLTPILLVGLLFA-VKGGGISM-----	
S_flexneri	104	YLCILPATVQSAIAFTSMAGGNVAAAACSASASSLLGIFLSPILLVGLVMN-VHC-AGGSLE-----	
E_coli	104	YLCILPATVQSAIAFTSMAGGNVAAAACSASASSLLGIFLSPILLVGLVMN-VHC-AGGSLE-----	
S_enterica	104	YLCILPATVQSAIAFTSLAGGNVAAAACSASASSLLGIFLSPILLVGLVMN-IHC-AQGSLE-----	
E_carotovora	106	YLCALPATVQSAIAYTSMAGGNVAAAACSASASSLLGVFLSPILLVGLLMH-TOGETDTLH-----	
Y_pestis	106	YLCALPATVQSAIAYTSVAGGNVAAAACSASASSLLGVFLSPILLVGLLMH-TOGETDTLH-----	
C_crescentus	116	FLCCLPSTVQSSIAFTSLARGNVAAAACSASASNLGIFITPVLVSVLMH-TOGAAGGWE-----	
C_diphtheriae	104	YLTLPSTVQSSVAFSTSLAGGNVAGAIIVSASASNLGVIAITPVLVMLMT-DNGGIHVDTS-----	
P_acnes	109	WICLPSTVQSSINFSTSLAHGNVAGAIIVATTSNLLGTFTPLALLLMS-TSGELTIQPS-----	
R_solanacearum	127	YLCALPSTVSSSVAMTMAKGNVPAATFNATISGLIGMVAITPILLMSFVIQ-ASCAELPVGK-----	
R_eutropha	114	YLCALPSTVSSSVAMTSMARGNVGAIFNATISGLIGMAVTPLLMLVIS-ASCASMPGK-----	
P_syringae	111	YLCALPSTVSSSVALTGSAGGNVPAAILNASMSVIGIFITPVLVSLVVG-TGAGGIDLGD-----	
A_thaliana	201	IFCCMPTTSSGVALTSLAGGNAAALAVTVASNLLGILTTFWVSRYTAGGVVSFPTDQ-----	
O_sativa	188	MFCCMPTTSSGVTLTQLVGGNTALALAMTAISNLLGIMTVPLSLAKYLGVGAEVSLPTEK-----	

```

M_musculus      166 --FTSIFSQLFMTVVVPLVIGQIVR---RYIKDWLERKKPPFGVSSSVLLMIYTTFC--DTFSNPNI
R_norvegicus    166 --FTSIFSQLFMTVVVPLVIGQIVR---RYIKDWLERKKPPFGVSSSVLLMIYTTFC--DTFSNPNI
H_sapiens       166 --FTSIFSQLFMTVVVPLIIGQIVR---RYIKDWLERKKPPFGAISSSVLLMIYTTFC--DTFSNPNI
C_familiaris    166 --FTSIFSQLFMTVVVPLIIGQIVR---RYIKDWLERKKPPFGAISSSVLLMIYTTFC--DTFSNPNI
X_laevis        166 --FTSIFSQLFMTVVVPLIIGQIVR---RYIKDWLERKKPPFGAISSCVLLMIYTTFC--DTFSNPNI
G_gallus        154 --FTSIFSQLFMTVVVPLIIGQIVR---RYIKDWLERKKPPFGTSSCVLLMIYTTFC--DTFANPNI
S_cerevisiae    192 ALYGRVMKQVGLSVFVPLFVGQVIONCFPKGTAYYIGFLKKYHIKIGSYMILLIMFSSFS--TAFYQDAF
K_lactis        218 QLYANVMKQVGLSVFVPLFVGQVIONVFPKQVTWFTTFRMN--KVGSFCLLLIMFSSFS--TAFYQDAF
D_hansenii      198 DLYREAMKQVGLSVFVPLFVGQVIONVFPKQTKWTTTFKLA--KVGSMFLLIMFQSF--TAFADAF
P_aeruginosa    165 -----AIGKITLQLLVPFIAGQVLR---RWIGAWVERNKPVLRVYDQGSILLVYVAFS--AAVIOGLW
P_putida        169 -----AVLKITLQLLVPFVAGQVAR---RWIGAWVKRNARWLKVVDQGSILLVYVAFS--EAVVTGLW
B_ambifaria     166 -----TVGSIVMQLLPFVAGQVLR---PVIGGWERNRGGVLRVYDQGSILLVYVAFS--EAVNIOGLW
R_abortus       162 -----ALESITLQLLAPFVLGQVLO---PEIGNVRRKARVLAVDRGSILLVYVAFS--EAIVEGLW
S_flexneri      163 -----QVGKIMLQLLLPFVLGHLSR---PWIGDWVRNKKWIAKTDQTSILLVYVAFS--EAVVNGIW
E_coli          163 -----QVGKIMLQLLLPFVLGHLSR---PWIGDWVRNKKWIAKTDQTSILLVYVAFS--EAVVNGIW
S_enterica      163 -----EVGKIMLQLLLPFVLGHLSR---PWIGNVVRNKKWIAKTDQTSILLVYVAFS--EAVVNGIW
E_carotovora    166 -----AIGSIMQLMVPFVIGHLSR---PLIAKWVERNKKLINITDRSSILLVYVAFS--EAVVQGIW
Y_pestis        166 -----AIGSIMQLMVPFVIGHLSR---PLIAKWVERHKKLVNITDRSSILLVYVAFS--EAVVQGIW
C_crescentus    176 -----SIQDITVQLLPFILGQVLR---PLVAKWVEKHKQVGYVDRGSILLVYVAFS--EAVVQGIW
C_diphtheriae   164 -----VFLKTAIQLLPFIAGQVLR---RWIKDIAAN--KATKIVDRGSIAMVYVAFS--AGMVAGIW
P_acnes         169 -----SFLDITVQLLPFVLGQVLR---RWTADFVTEHRKSLKYVGQGSILLVYVAFS--EGMREHMW
R_solanacearum  187 -----ALLGVAEQLLLPFVLGQVLR---PAIGGFITTRYKAIINKVDRAVILLVENSFA--DSTHAGVW
R_eutropha      174 -----ALMGVALQLLPFALGQVLR---PLIGSNLAKKKHITNKIDRGVIVLVYSSFC--DATAEGLW
P_syringae      171 -----TLLDICAMLLLPFVLGQVLR---PLLGKIFARHKKYTNLIDKLIVILLVYVAFS--NSMISCMW
A_thaliana      262 -----LFRSLIVTLLIPLIIGQVIR--ESFGGFANFVDNNRKLFSKINAICLSLVPWIVQVRSRSLLSVQ
O_sativa        249 -----LFKSLVTTLLIPLIIGQVIR--ETSKGIAGFVDGNKQGFVTSAILLSLVPWIVQVRSRSLLSVQ

```

```

M_musculus      228 D--DKFSLILILFIIVSVQLSEMLLTFIFS-----TRNNSG-----FTPADTV
R_norvegicus    228 D--DKFSLILILFIIVSVQLSEMLLTFIFS-----TRNNSG-----FTPADTV
H_sapiens       228 D--DKFSLVILILFIIFSIVQLSEMLLTFIFS-----TRNNSG-----FTPADTV
C_familiaris    228 D--DKFSLILILFIIFSIVQLSEMLLTFIFS-----TRNNSG-----FTPADTV
X_laevis        228 D--DTFSLVIVFIIFIIFQLAFMLLTFIFS-----TSKNNSG-----FTPADTV
G_gallus        216 D--DKFSLIIVFIIFSIVQMSFMLLTFIFS-----TRSNNSG-----FTPADTV
S_cerevisiae    260 TSVSHVCIIFLCFFNLGIYIFFTGLSYICARPWFILKLPHEPIEGKSTRLYRYSYNIFRPFYYSKEDAI
K_lactis        284 TSVSHACIIFLCFFNVGIYLFFTLVCFVCAWPFIKIFDHEPTTEH--SSKTYTICYKIFRPFYYSKRDAL
D_hansenii      264 TSVSHESIIFLVFFNICIYLFFTVMTYFYSRPLFILRYFNNEPNES--HSKAYKYGYKLLRPFYYNRDTV
P_aeruginosa    224 HEVPWLALLGLTVACCILALALVLTITVLR-----RLGFSKEDRI
P_putida        228 HTVSPQHLAGTFVVCALLAVVLFGLTRILGK-----ALGFDLEDRI
B_ambifaria     225 HQIPARALGGLLVNVVLLVIALVLTITVSK-----RLGFNRADQI
R_abortus       221 RTVSWDDLGMVGVNILLAVVLLATWYGSK-----WLGFSREDRI
S_flexneri      222 HKVWGSLLFIVVVSVLLAIVVVNVFMAR-----RLSFNKADEI
E_coli          222 HKVWGSLLFIVVVSVLLAIVVVNVFMAR-----RLSFNKADEI
S_enterica      222 HKVWGSLLFIVVVSVLLAIVVAINVFMAR-----KCGFNKADEI
E_carotovora    225 GQINGWSLLAVVGCIVLLAIVLVNNTVLR-----KLGFNKADEI
Y_pestis        225 SQIDGWSLLATSVCSMVLITVVLVNTVLR-----WLGFNKADEI
C_crescentus    235 SKVSALEMVLLVACCLLAIIVTAATTYGAR-----ALGFSKEDRI
C_diphtheriae   221 STVSLGEIIFLVAFSILVGFMLWETRWSAQ-----KLCFARGDVI
P_acnes         228 SLVSPASMVLTLLICLALLFFMLWLTWTGSG-----WLDENRNDRI
R_solanacearum  246 SKYPWETIVAVAIMSGALLFVVLGATTWTAR-----RFGFGLADEI
R_eutropha      233 HHYQWQTIAAVMALAAVLLFVVLGTTTFVAR-----RIHFSVEDEI
P_syringae      230 QSQGSNVILTAFIGTALLAVILLMTTTRAR-----ALKFDHADKV
A_thaliana      326 PKVFLAAGIGITLHLSLLAFNAVSIIRLSG-----LTGGSK--SSKENST
O_sativa        313 PKAFAVAVTVGVLLHFALLAFNAAALHLSR-----LEQRGVSVFARNEYAR

```

M_musculus	270	AIIFCSTHKSLTLGIPMLKIVFAG-HEHLSLISVPLLIYHPAQILLGSVLVPTIKSWMVSROKQ-----
R_norvegicus	270	AIIFCSTHKSLTLGIPMLKIVFAG-HEHLSLISLPLLIYHPAQILLGSVLVPTIKSWMVSROKQ-----
H_sapiens	270	AIIFCSTHKSLTLGIPMLKIVFAG-HEHLSLISVPLLIYHPAQILLGSVLVPTIKSWMVSROKQ-----
C_familiaris	270	AIIFCSTHKSLTLGIPMLKIVFAG-HEHLSLISVPLLIYHPVQILLGSVLVPTIKSWMVSROKHT-----
X_laevis	270	AIIFCSTHKSLTLGIPMLKIVFAG-YEHLSLISVPLLIYHPAQILLGSVLVPTIKSWMVSROKQ-----
G_gallus	258	AIIFCSTHKSLTLGIPMLKIVFAG-YEHLSLISVPLLIYHPAQILLGSVLVPTIKSWMVSROKQ-----
S_cerevisiae	330	CIIFCGPAKTAALGVSLITISQYCDKKEHLGKLLVPLVLYQVEQVMTANFFVSLFRWIKDAQA----DG
K_lactis	353	AVILCGAAKTAALGVSLITISQYCDNPKLGTLLVPLVLYQSEQVITANFVFPFMKWAS-----DE
D_hansenii	333	AIILCGPAKTAALGVSLITISQYCSKNENLGKLLVPLVLYQAEQVITAQVLVNFMKWIYAEDKKPDDIES
P_aeruginosa	265	TIIFCGSKKSLATGVPMKVLFAF--SAGVPMVLPLMIFHQIQLMVCVLAQRYARRR-----
P_putida	269	TIIFAGSKKSLATGVPMKVLFAF--SGIGAMILPLMIFHQIQLMVCVLAQRYASR-----
B_ambifaria	266	TIIFCGSKKSLAAGVPMKVLFAF--QAVGATVPLMIFHQIQLMACAALAQRYGARDLSGERDG-----
B_abortus	262	TIIFCGSKKSLASGALMANAIFAG--ANVGNIIVPLMIFHQIQLMACATIAKLAER-----
S_flexneri	263	TIIFCGSKKSLANGIPMANILFPT--SVLGMMVLPLMIFHQIQLMVCVLAQRYARRYKROTEQLQAQQ-----
E_coli	263	TIIFCGSKKSLANGIPMANILFPT--SVLGMMVLPLMIFHQIQLMVCVLAQRYARRYKROTEQLQAQQ-----
S_enterica	263	TIIFCGSKKSLANGIPMANILFPT--SVLGMMVLPLMIFHQIQLMVCAGLARRYKROTEQLQAQQ-----
E_carotovora	266	TIIFCGSKKSLANGIPMANVLEPA--AAVGAMVLPLMIFHQIQLMVCVLAQRYAKRLNKEQ-----
Y_pestis	266	TIIFCGSKKSLANGIPMANVLEPA--SVVGMMVLPLMIFHQIQLMVCVLAQHYAKRMAREQAEGGLDVM
C_crescentus	276	TIIFCGSKKSLATGVPMAGILFPG--PTAGVIVLPLMIFHQIQLMACSVTAQHYAKRP-----
C_diphtheriae	262	AIIFCGTKKSLASGLPMAVIFAG--ANLGLLILPLMIFHQIQLMCSWLASRYAQH-----
P_acnes	269	AIIFCGTKKSLATGLPMATVLFAG--QPVGLIIVLPLMIFHLAQLIACGLAGRYAQH-----
R_solanacearum	287	TAIFCGSKKSLANGVPMKILFAGN-PALGLIIVLPLMIFHQIQLIVCSTLARRYADRIAHAED-----
R_eutropha	274	TAIFCGSKKSLANGIPMANILFACH-PALGLLIVLPLMIVYHQIQLIVCSVLAARYANRDALVED-----
P_syringae	271	AAVFCATKKSLAAGAPMAALIFCSN-PGLGLIILPLMIFHPMOLIVCSIIAESVASRHRQQLS-----
A_thaliana	370	AVILVSSOKTILPVMVAVEQLGGA-FGETGLIIVLPCVAAHLNQIMIDSVLVNLALRRG-----
O_sativa	360	AVILVASOKTILPVLVAVEQLGGA-LGESGLIIVLPCVAAHINQIIDSILIVNWNLRD-----

M_musculus	333	----VKLTR-PTV-----
R_norvegicus	333	----VKLTR-PTV-----
H_sapiens	333	----VKLTR-PTV-----
C_familiaris	334	----CKLVS-TKCET-----
X_laevis	333	----LKLTRQPKIPL-----
G_gallus	321	----LKLTRQPKVPVKV-----
S_cerevisiae	396	SESSCANENEEVDLEKIIISIGTGENQSVLSNNVPYTQPR-----
K_lactis	414	DEHGKIIKQPTDEESRISQ--NKEDVSKENTEDADSRD-----
D_hansenii	403	DEHGDKNSPIESEQNSVGDNDSESQVSRHNSITNLGDTNKLSP
P_aeruginosa	321	---DDAAALAEAPSR-----
P_putida	324	---EQAVEASAVS-----
B_ambifaria	329	---EDAAAGTARTQGTINAGKR-----
B_abortus	317	---HEIRP-----
S_flexneri	326	---ESSADKA-----
E_coli	326	---ESSADKA-----
S_enterica	326	---ESRAAKA-----
E_carotovora	326	---DTPHQ-----
Y_pestis	334	PTVNDSTQ-----
C_crescentus	332	---SEIVEA-----
C_diphtheriae	317	---ASKMSA-----
P_acnes	324	---WEVEQ-----
R_solanacearum	349	---RAADRAGQPA-----
R_eutropha	336	---RAAARA-----
P_syringae	333	---QAALAEAQA-----
A_thaliana	427	---KDTSTKVKA-----
O_sativa	417	---QQFANAK-----

Danksagungen

Beim Schreiben dieser letzten Worte denke ich an all die Menschen, die direkt oder indirekt zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben. Insbesondere möchte ich mich bedanken bei:

Herrn Prof. Dr. Ernst Petzinger für die Überlassung des Themas, Orientierungshilfen, die ständige Unterstützung und Motivation. Vor allem danke ich ihm für das entgegengebrachte Vertrauen, das Interesse an meiner beruflichen Entwicklung und die rasche sorgfältige Korrektur meiner Doktorarbeit (auch während seines Urlaubs).

Herrn Dr. Joachim Geyer, der mich durch die Höhen und Tiefen dieser Dissertation geleitet hat. Ich konnte von seiner Fachkompetenz sehr profitieren. Danke Achim für deinen Ideenreichtum, die zahlreichen Anregungen und Diskussionen, die Korrektur meiner Doktorarbeit und das volle Vertrauen. Ganz besonders positiv (und vielleicht das Wichtigste) ist deine Begeisterung für die Forschung, die ansteckend wirkt. Es ist mir ein besonderes Anliegen, mich an dieser Stelle für die tolle Zusammenarbeit beim innovativen Projekt „MDR1-Defekt beim Collie“, das wir (Achim, Barbara, José) am Anfang „nebenbei“ gemacht haben, zu bedanken.

Meinen Kolleginnen Barbara Döring, Carla Fernandes und Olga Gavrilova für die schöne Zusammenarbeit, die erholsamen Kaffeepausen und die stete Hilfsbereitschaft. Ganz besonders danke ich Barbara für die Hilfe bei der Radioimmunpräzipitation und den Zellmessungen. Carla, meine Gefährtin auf der Suche nach einer Funktion der „komischen“ Proteine P5 und P7, danke ich für die Ideen, Anregungen und den Spaß während der aufwändigen Laborarbeit. Deine Freundlichkeit und gute Laune trug wesentlich zur Schaffung einer angenehmen Arbeitsatmosphäre bei. Carla, boa sorte.

Herrn Dr. Jörg Alber für seine kompetente Hilfe und zahlreichen Tipps, Klaus Schuh für die Hilfsbereitschaft und technische Unterstützung, Kurt Stumpf für die schöne Handzeichnung der Hydrophobizitätsmodelle von P7, Regina Leidolf danke ich für die technische Unterstützung, erholsamen Pausen und zahlreichen Aufmerksamkeiten (Süßigkeiten, Zeitschriften, etc). Kerstin Meerkamp danke ich für die Hilfe bei der quantitativen PCR, Frau von Schnakenburg für ihre Hilfe bei allen bürokratischen Angelegenheiten und allen anderen Mitarbeitern, die nicht namentlich genannt wurden, aber an der Entstehung dieser Arbeit mitgeholfen haben.

Herrn Dr. Knut Beuerlein danke ich für die professionelle Hilfe und Beratung am Fluoreszenzmikroskop, besonders bei der Erstellung der dreidimensionalen Zell-Rekonstruktion sowie für die Korrektur meiner Doktorarbeit.

Frau Jana Heber danke ich für ihren Beistand und dafür, dass sie sich um meine Zukunft und die meiner Familie gekümmert hat. Gleichzeitig danke ich dem Graduiertenkolleg „Molekulare Veterinärmedizin“ für die finanzielle Unterstützung und die Möglichkeit, an Praktika und Seminaren teilzunehmen.

Den Mitarbeitern des Katholischen Akademischen Ausländer-Dienstes (KAAD) Renate Flügel und Thomas Krüggeler aus Bonn und Christian Jeuck aus der Katholischen Hochschulgemeinde in Gießen (KHG).

Meinen Freunden, ohne die mein Leben sehr viel langweiliger wäre. Insbesondere Vini, Gleyder, Alex, Yerko, Verena, Manuel, Carlos, Soledad und Reinhard. Den Familien Kühle und Buchholtz., die mir am Anfang meines Aufenthaltes in Deutschland sehr viel geholfen haben.

Meinen Eltern, José Manuel Godoy und Cecilia Berthet, die immer großen Wert auf meine Ausbildung gelegt haben und meine Reise nach Deutschland ermöglichten. Muchas gracias.

Meiner Frau Marcela, die mich immer unterstützt und vorangetrieben hat und unserem Sohn Vicente Jesús, der mir jeden Tag Kraft und Selbstbewusstsein gibt. Ohne sie hätte ich es niemals geschafft. Por éso y todo lo demás, dedico ésta pequeña obra a ustedes con mucho amor y admiración.

Diese Arbeit wurde in den Jahren 2003-2006 durch ein Stipendium des Katholischen Akademischen Ausländer-Dienstes (KAAD) und Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) im Graduiertenkolleg „Molekulare Veterinärmedizin“ an der Justus-Liebig-Universität Gießen gefördert.

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D - 3 5 3 9 6 G I E S S E N

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5122-X



9 783835 195122 8